GENOMICA

volumul I

SUB REDACȚIA
PROF. DR. LUCIAN GAVRILĂ

editura enciclopedică

AUTORII ÎN ORDINE ALFABETICĂ:

Ruxandra ACHIM, Gabriela ANTON, Petruța-Pompilia APOSTOL, Aurel ARDELEAN, Nicolai BĂRBĂCAR, Gabriela BORDEIANU, Liliana BURLIBAȘA, Marius CÂRLAN, Ramona CERNAT, Dan CIMPONERIU, Natalia CUCU, Maria DAMIAN, Letiția-Corina DAN, Margareta DUMITRESCU, Lorelai-Bianca GAVRILĂ, Lucian GAVRILĂ, Valeria-Rozalinda GAVRILĂ, Laura-Monica GEORGESCU, Claudia HASSELMANN, Rodica ION, Francisc MIXICH, Ionela MOANȚĂ, Rozalia PETCU, Adriana PLEȘA, Luis POPA, Olivia POPA, Rodica REPANOVICI, Irina RADU, Florina RAICU, Maria STRĂUȚ, Rodica TĂLMACI, Gabriela ȚENEA, Alexandru VLADIMIRESCU, Dana UȘURELU

Fiecare autor/autori de capitole poartă întreaga responsabilitate privind rigoarea științifică și utilizarea în condiții legale a surselor de informații.

Această carte a apărut cu sprijinul
Ministerului Educației, Cercetării și Tineretului

ISBN: 973–45–0463–0
ISBN: 973–45–0464–9

GENOMICA

UN TRATAT DESPRE GENOM,
DE LA VIRUSURI LA OM

VOLUMUL I

PRINCIPII DE EREDITATE —
FUNDAMENTELE MOLECULARE
ȘI CELULARE ALE EREDITĂȚII

Lucian GAVRILĂ (sub redacția)

Se dedică acest tratat celor trei mai personalități ale intelectulității românești dintotdeauna:

Acad. Nicolae Cajal
Acad. Mihai Zamfirescu
Acad. Constantin Bălăceanu-Stolnici,

care, ca nimeni alții, au înțeles importanța Geneticii și au sprijinit dezvoltarea ei în România

„Un singur lucru nu-ți poate răpi Fortuna:
Ce-ai dăruit la alții, e pentru totdeuna.
Căci toate-s trecătoare, să fii cât de bogat,
Iar ție nu-ți rămâne, întreg, decât ce-ai dat.“
Poetul latin Martial

CUPRINS

CAPITOLUL I. EVOLUȚIA CONCEPȚIEI DESPRE GENĂ: DE LA INTUIȚIA NATURII CORPUSCULARE, CHIMICE, A FACTORILOR EREDITARI, LA DESCOPERIREA SUBSTRATULUI CHIMIC AL EREDITĂȚII 1
(Lucian GAVRILĂ)
1. INTRODUCERE ÎN CUNOAȘTEREA FENOMENULUI EREDITĂȚII 1
2. DOVEDIREA ROLULUI GENETIC AL ADN ÎN EREDITATE 7
3. ASPECTE ALE STRUCTURII CHIMICE ȘI FIZICE A ADN 13
4. EXCEPȚII DE LA STRUCTURA BICATENARĂ A ADN 32
5. ALTE ASPECTE ALE STRUCTURII CHIMICE A ADN .33
6. DENATURAREA ȘI RENATURAREA ADN 34
7. TAUTOMERIA BAZELOR AZOTATE ȘI SEMNIFICAȚIA SA MUTAȚIONALĂ 42

CAPITOLUL II. DINAMICA CELULARĂ A GENOMULUI(DIVIZIUNEA CELULARĂ) 45
(Lucian GAVRILĂ)
1. MITOZA ȘI SEMNIFICAȚIA SA ÎN EREDITATE 45
2. MEIOZA ȘI SEMNIFICAȚIA SA ÎN EREDITATE 52

CAPITOLUL III. ELEMENTE DE COMANDĂ ȘI DE CONTROL ÎN ASIGURAREA INTEGRALITĂȚII CROMOZOMULUI EUCARIOT 67
(Lucian GAVRILĂ, Valeria-Rosalinda GAVRILĂ și Lorelai-Bianca GAVRILĂ)
1. GENERALITĂȚI 67
2. CENTROMERUL 68
3. CINETOCORUL (KINETHOCOR) 72
4. CONSTRICȚII SECUNDARE 74
5. TELOMERE 80
6. DILEMA TERMINALIZĂRII REPLICĂRII MOLECULELOR LINIARE DE ADN DIN CROMOZOMUL EUCARIOTIC ȘI DESCOPERIREA TELOMERAZEI 91
7. TELOMERELE ȘI MEDICAMENTELE 103
8. CROMOZOMII ARTIFICIALI 103
9. BIBLIOTECA ADN 105

CAPITOLUL IV. ORGANIZARE GENICĂ 107
(Lucian GAVRILA și Aurel ARDELEAN)
1.GENE PARALOGE ȘI GENE ORTOLOGE 107
2. CEASURILE MOLECULARE ÎN EVOLUȚIA GENOMULUI 110
3. GENELE PENTRU ARNR 18S, 5,8S ȘI 28S 112
4. GENELE PENTRU ARNR 5S 116
5.GENELE PENTRU ARNT 118
6.GENELE PENTRU ARN NUCLEAR MIC (SNRNA) ȘI ARN CITOPLASMATIC 120
7. GENELE CODIFICATOARE DE POLIPEPTIDE 121
8. GENELE PENTRU ACTINĂ 125
9. GENELE TUBULINEI 127
10. SUPERFAMILIA GENELOR GLOBINICE 129
11. FAMILIA GENICĂ A A-AMILAZEI 134
12. GENELE PENTRU INTERFERON 135
13. GENELE PENTRU HISTONE 137
14. SECVENȚE CONSENS 141

CAPITOLUL V. REPLICAREA ACIZILOR NUCLEICI 143
(Lucian GAVRILA)
1. GENERALITĂȚI 143
2. IPOTEZA REPLICONULUI 151
3. ORIGINEA REPLICĂRII 154
4. TOPOLOGIA ADN ȘI REPLICAREA 155
5. INIȚIEREA REPLICĂRII 164
6. ELONGAREA REPLICILOR 169
7. SINTEZĂ REPLICATIVĂ ȘI SINTEZĂ REPARATORIE 178
8. REPLICAREA REPLICONILOR LINEARI 182
9. REPLICAREA REPLICONILOR CIRCULARI (MODELUL INELULUI ROTATIV) .185
10. CONTROLUL CELULAR AL REPLICĂRII 190
11. APOPTOZA 207
12. BIOCHIMIA BIFURCAȚIEI DE REPLICARE 214
13. TERMINALIZAREA REPLICĂRII 218
14. SIMILITUDINEA MECANISMELOR DE BAZĂ ALE REPLICĂRII LA PROCARIOTE ȘI EUCARIOTE. 220
15. AMPLIFICAREA ADN-REACȚIA POLIMERIZĂRII ÎN LANȚDE CĂTRE POLIMERĂ (POLYMERASE CHAIN REACTION — PCR) 222

CAPITOLUL VI. ORGANIZAREA PROCESULUI DE TRANSCRIERE GENETICĂ 225
(Lucian GAVRILĂ, Valeria-Rosalinda GAVRILĂ și Lorelai-Bianca GAVRILĂ)
1. INTRODUCERE — GENERALITĂȚI 225
2. SELECȚIA PROMOTORULUI 231
3. SITUSUL CAP 236
4. INIȚIEREA CATENEI POLIRIBONUCLEOTIDICE 238
5. ELONGAȚIA (ALUNGIREA) CATENEI POLIRIBONUCLEOTIDICE 243

6. TERMINAREA SINTEZEI CATENEI POLIRIBONUCLEOTIDICE ȘI ELIBERAREA ARN NOU SINTETIZAT 244
7. TIPURI DE ARN CELULAR 251
7.1 ARNMESAGER (ARNM) 252
7.2 ARN RIBOZOMAL (ARNR) ȘI ARN DE TRANSFER (ARNT) 254
8. PROCESAREA MOLECULELOR PRECURSOARE DE ARNT 260
9. PROCESAREA ARN RIBOZOMAL LA ESCHERICHIA COLI 264
10. TRANSCRIEREA GENETICĂ LA EUCARIOTE 265
11. ARN POLIMERAZELE EUCARIOTE 266
11. CĂPĂCIREA (CAPPING) SAU BONETAREA CAPĂTULUI 5'AL ARNM ȘI POLIADENILAREA TERMINALULUI SĂU 3' 267
12. MOZAICISMUL GENELOR EUCARIOTE ȘI CONSECINȚA SA — PROCESUL DE SPLICING 270
14. GENELE RIBOZOMALE ȘI ARNR LA EUCARIOTE 276
15. ETAPE ÎN FORMAREA ARNR 18S; 5, 8S ȘI 28S DINTR-UN TRANSCRIPT PRIMAR 280
16. ARN ANTIMESAGER 283
17. GENE ANTISENS 284
18. ATENUAREA TRANSCRIPȚIEI GENETICE LA PROCARIOTE 286
19. ENHANCERII - AMPLIFICATORI AI TRANSCRIPȚIEI 287
20. EDITAREA (EDITING) ARNM 293
21. INSULATORII CROMATINICI 296

CAPITOLUL VII. RIBOZIMELE — ARN CU PROPRIETĂȚI ENZIMATICE ; INTRONII ȘI MECANISMELE DE SPLICING 311
(Lucian GAVRILĂ, Aurel ARDELEAN, Letiția Corina DAN, Florina RAICU și Gabriela BORDEIANU)
1. RIBOZIMELE — MOLECULE ARN CU CAPACITĂȚI CATALITICE 311
2. INTRONII ȘI MECANISMELE DE SPLICING 315
  2.1. INTRODUCERE 315
  2.2. INTRONII ÎN GENELE NUCLEARE TRANSCRISE ÎN ARNM 316
  2.3. INTRONII ÎN GENELE PENTRU ARNT 319
  2.4. INTRONI GRUP II 321
  2.5. INTRONI CU SPLICING AUTOCATALITIC 322
  2.6. INTRONI GRUP I AUTOCLIVATORI (SELFSPLICING) 322
  2.7. SPLICING-UL INTRONILOR DIN PRE-ARNM NUCLEAR 327
  2.8. SPLICEOSOM 327
  2.9. TRANSPLICING 334
  2.10 SPLICING-UL ARNT-URILOR 336
  2.11. SPLICING-UL ALTERNATIV GENEREAZĂ ARNM-URI PENTRU NUMEROASE PROTEINE CODIFICATE ÎN ACEEAȘI GENĂ 336
  2.12. PATTERN-URI DE SPLICING ALTERNATIV 338

CAPITOLUL VIII. CODIFICAREA BIOCHIMICĂ — CODUL GENETIC 343
(Lucian GAVRILĂ, Lorelai-Bianca GAVRILĂ și Valeria-Rosalinda GAVRILĂ)
1. CODUL GENETIC UNIVERSAL 343

2. ELUCIDAREA SECVENȚEI DE BAZE AZOTATE A CODONILOR 348
3. IDENTIFICAREA CODONILOR STOP 350
5. CODUL GENETIC AL MITOCONDRIILOR 356

CAPITOLUL IX. DECODIFICAREA SAU TRANSLAȚIA (TRADUCEREA) MESAJULUI GENETIC 359
(Lucian GAVRILĂ și Aurel ARDELEAN)
1. ROLUL ARNT ȘI AL AMINOACIL-ARNT-SINTETAZELOR 359
2. AMINOACIL-ARNT-SINTETAZELE (AMINOACIL–ARNT–LIGAZE) 365
INTERACȚIA CODON-ANTICODON 368
4. ROLUL RIBOZOMILOR ÎN SINTEZA PROTEINELOR. DECODIFICAREA MESAJULUI GENETIC 372
5. DIVERSITATEA AMINOACIL-ARNT-SINTETAZELOR 380
6. DECODIFICAREA ȘI FENOMENUL DE SUPRESIE A MUTAȚIILOR 383
7. ARNT SUPRESORI NONSENS 386
8. TERMINAREA NORMALĂ ÎN PREZENȚA UNUI ARNT SUPRESOR 389
9. SUPRESIA MISSENSE PRIN ÎNCĂRCAREA ERONATĂ 391
10. SUPRESORI FRAMESHIFT (DE SCHIMBARE A CADRULUI) 391
11. SUPRESORI TERMOSENSIBILI —SENSIBILI LA TEMPERATURĂ (TS) 392

CAPITOLUL X. REGLAREA ACTIVITĂȚII GENICE LA PROCARIOTE 395
(Lucian GAVRILĂ, Valeria-Rosalinda GAVRILĂ și Lorelai-Bianca GAVRILĂ)
1. INTRODUCERE 395
2. MODELUL OPERON. OPERONUL LAC AL BACTERIEI EPCHERICHIA COLI ... 399
3. OPERONUL TRIPTOFAN AL BACTERIEI ESCHERICHIA COLI 407
   3.1. ELEMENTELE OPERONULUI TRP 407
   3.2. ATENUATORUL ȘI POLIPEPTIDUL LIDER 409
4. OPERONUL HUT (PENTRU UTILIZAREA HISTIDINEI) 410
5. OPERONUL REC A 412
6. ROLUL PROTEINELOR RIBOZOMALE ÎN PROPRIA LOR TRANSLAȚIE 414

CAPITOLUL XI. REGLAREA ACTIVITĂȚII GENICE LA EUCARIOTE 417
(Lucian GAVRILĂ, Valeria-Rosalinda GAVRILĂ și Lorelai-Bianca GAVRILĂ)
1. GENERALITĂȚI 417
2. REGLARE PE TERMEN SCURT. ROLUL HORMONILOR, AL HISTONELOR ȘI AL NONHISTONELOR 421
3. REGLAREA GENETICĂ PE TERMEN LUNG. HETEROCROMATINIZAREA ȘI EFECTUL DE POZIȚIE 426
4. INACTIVAREA PRIN HETEROCROMATINIZARE SPECIFICĂA UNOR ANUMIȚI CROMOZOMI — LIONIZAREA 428
5. EFECTUL DE POZIȚIE 431
6. POZIȚIA GENELOR ÎN CROMOZOMI ȘI REGLAREA ACTIVITĂȚII GENICE 433
7. HORMONII SEXUALI ȘI REGLAREA ACTIVITĂȚII GENICE 435

CAPITOLUL XII. CITODIFRENȚIEREA SAU DIFERENȚIEREA STRUCTURAL-FUNCȚIONALĂ A CELULELOR 437
(Lucian GAVRILĂ, Valeria-Rosalinda GAVRILĂ, Lorelai-Bianca GAVRILĂ)
1. GENERALITĂȚI 437
2. ROLUL CITOPLASMEI ÎN CITODIFERENȚIERE 442
3. AMPLIFICAREA GENICĂ ÎN OVOGENEZĂ 445
4. FUZIUNEA DE CELULE ȘI DESCIFRAREA MECANISMELOR DE REGLARE A ACTIVITĂȚII GENICE 447
5. MOZAICISM SEXUAL 448
6. DETERMINAREA ȘI TRANSDETERMINAREA 448
7. ELEMENTE GENETICE TRANSPOZABILE ȘI REGLAREA ACTIVITĂȚII GENICE 450
8. DESTRUCȚIA GENICĂ PROGRAMATĂ ȘI RAPORTURILE CU APOPTOZA 451

CAPITOLUL XIII. BIOLOGIA MOLECULARĂ A DEZVOLTĂRII EMBRIONARE ... 453
(Aurel ARDELEAN și Lucian GAVRILĂ)
1. GENERALITĂȚI 453
2. ASPECTELE GENETICE ALE EMBRIOGENEZEI 458
3. POLARITATEA DORSO-VENTRALĂ POATE FI STABILITĂ DE UN GRADIENT MORFOGENETIC 460
4. GENELE HOMEOTICE 462
5. MUTAȚIILE HOMEOTICE 467
6. CONTROLUL GENETIC AL SEGMENTĂRII 468
7. CONTROLUL POZITIV AL FUNCȚIEI GENICE PRIN STEROIZI 472
8. PROTEINELE PAX — CHEIA FACTORILOR DE TRANSCRIPȚIE ÎN EMBRIOGENEZĂ 474
9. SPECIFICITATEA TRANSCRIPȚIONALĂ A ARN POLIMERAZEI 475
10. REGLAREA GENELOR HOX 477
11. FACTORI DE TRANSCRIPȚIE SPECIFICI TIROIDIENI 478
12. FUNCȚIILE MEDIATE DE CITOKINE ALE PROTEINELOR ÎNRUDITE CU NFKB 479
13. ROLUL RECEPTORILOR NUCLEARI ÎN DIFERENȚIEREA MIELOIDĂ 481
14. CONTROLUL EXPRESIEI GENICE DE CĂTRE RECEPTORII NUCLEARI 482
15. SCHIMBAREA TIPULUI DE HEMOGLOBINĂ 485
16. TRANSCRIPȚIA SPECIFICĂ FICATULUI 487
17. METILAREA ȘI DEZVOLTAREA ONTOGENETICĂ 489
18. BATERIILE GENICE ȘI „LOGICA LOR ORGANIZATORIC-FUNCȚIONALĂ" 491
19. ARHITECTURA REGLATOARE A GENOMULUI 494

CAPITOLUL XIV. GENELE HOMEOTICE LA ANIMALE 501
(Liliana BURLIBAȘA, Lucian GAVRILĂ și Aurel ARDELEAN)
1. GENERALITĂȚI 501
2. GENELE DEZVOLTĂRII EMBRIONARE 502
3. ORGANIZAREA AXEI DORSO-VENTRALE 504
4. GENELE HOX LA CAENORABDITIS ELEGANS 513
5. GENELE HOX LA VERTEBRATE 514
6. EVOLUȚIA GENELOR HOMEOTICE 518

CAPITOLUL XV. GENELE HOMEOTICE LA PLANTE 521
(Gabriela ȚENEA, Irina RADU, Lucian GAVRILĂ)
1. INTRODUCERE 521
2. PROCESELE DE INDUCȚIE (INIȚIERE) FLORALĂ 523
3. PRINCIPALELE MUTANTE HOMEOTICE LA ARABIDOPSIS THALIANA 525
4. MUTAȚII ALE GENELOR CE AFECTEAZĂ DEZVOLTAREA PRIMORDIULUI FLORAL 525
5. MUTAȚII ALE GENELOR CE AFECTEAZĂ SIMETRIA 527
MUTANTE CE AFECTEAZĂ IDENTITATEA DE ORGAN 528
6. PRINCIPALELE MUTANTE HOMEOTICE LA ANTIRRHINUM MAJUS 532
7. UN NOU MODEL AL IDENTITĂȚII ORGANELOR FLORALE 533
8. CARACTERISTICI GENERALE ALE GENELOR HOMEOTICE 535

CAPITOLUL XVI. ELEMENTELE TRANSPOZABILE ȘI CONTRIBUȚIA LOR ÎN EVOLUȚIA GENOMULUI PLANTELOR 537
(Gabriela ȚENEA)
1. GENERALITĂȚI 537
2. TIPURI DE ELEMENTE TRANSPOZABILE 537
3. ELEMENTELE TRANSPOZABILE ȘI EVOLUȚIA STRUCTURII GENOMULUI 540

CAPITOLUL XVII. HETEROZOMI LA PLANTE 543
(Lucian GAVRILĂ, Liliana BURLIBAȘA și Letiția-Corina DAN)
1. INTRODUCERE 543
2. MECANISMELE DETERMINĂRII SEXULUI LA PLANTELE DIOICE 547
3. RAPORTUL DINTRE SEXE (SEX RATIO) 551
4. GENELE SEXULUI 551
5. SEPARAREA GENETICĂ A SEXELOR LA PLANTELE MONOICE 553
6. EVOLUȚIA DIVERSITĂȚII SEXUALE LA PLANTE 556

CAPITOLUL XVIII. DIFERENȚIEREA CROMOZOMILOR DE SEX ȘI TRANZIȚIA DE LA HERMAFRODITISM (COSEXUALITATE) LA UNISEXUALITATE 559
(Aurel ARDELEAN)
1. INTRODUCERE 559
2. EVOLUȚIA SEXELOR SEPARATE (UNISEXUALITĂȚII) ȘI CROMOZOMII PRIMITIVI AI SEXELOR 561
3. EVOLUȚIA UNUI CROMOZOM Y DEGENERAT ȘI COMPENSAȚIA DE DOZĂ 563
4. ACUMULAREA DE SECVENȚE REPETATE DE ADN ÎN CROMOZOMUL Y 564

CAPITOLUL XIX. EVOLUȚIA SEXELOR, CROMOZOMII SEXUALI ȘI GENELE SEXUALIZANTE 567
(Marius CÂRLAN)
1. INTRODUCERE 567
2. HERMAFRODITISMUL – O CALE DE SEXUALIZARE PRIMITIVĂ LA EUCARIOTE 567

3. INVERSAREA SPONTANĂ A SEXELOR ... .569
4. DIFERENȚIEREA SEXELOR SUB INFLUENȚA TEMPERATURII MEDIULUI
ŞI A HORMONILOR SEXUALI ENDOGENI ... .570
5. GONOCORISMUL ... .571
6. CROMOZOMII SEXUALI ... .573
7. TIPURI DE DETERMINISM CROMOZOMAL AL SEXELOR ... .574
8. SEPARAREA SEXELOR ÎN RELAȚIE CU PREZENȚA SAU ABSENȚA
CROMOZOMILOR SEXUALI SPECIALIZAȚI ... .576
9. GENELE SEXUALIZANTE ... .580
10. GENA SRY/SRY ... .584
11. GENA AMH/AMH ... .586
12. GENA SF-1/SF-1 ... .587
GENA WT-1/WT-1 ... .588
13. GENELE SOX/SOX ... .588
14. GENA DAX-1/DAX-1 SAU AHC/AHCH ... .589
15. GENA DMRT-1/DMRT-1 ... .590
16. GENA WNT-4 ... .591
17. GENELE SEXUALIZANTE EVIDENȚIATE LA MAMIFERE SUNT PARȚIAL
IDENTIFICATE LA REPTILE ȘI PĂSĂRI ... .591

**CAPITOLUL XX. ARHITECTURA MATERIALULUI GENETIC
IN GAMETOGENEZA LA ANIMALE ... .593**
(Lucian GAVRILĂ și Liliana BURLIBAȘA)
1. PROTEINELE CROMOZOMALE ȘI ROLUL ACESTORA ÎN ASIGURAREA
STRUCTURII ȘI FUNCȚIEI MATERIALULUI GENETIC ÎN GAMETOGENEZA ... .593
2. HISTONELE ... .594
3. SUBTIPURILE HISTONICE TESTICULARE ... .597
4. PROTAMINELE ... .599
5. COMPONENTELE PROTAMINE-LIKE ... .600
6. ARHITECTURA MATERIALULUI GENETIC ÎN OVOGENEZA. -FENOTIPUL
CROMOZOMAL LAMPBRUSH- ... .600
7. ORGANIZAREA FUNCȚIONALĂ A CROMOZOMILOR LAMPBRUSH ... .607
8. MECANISMUL MOLECULAR AL AMPLIFICĂRII ADNR LA NIVELUL
BUCLELOR LAMPBRUSH ... .609
9. ROLUL AMPLIFICĂRII GENICE DIN OVOGENEZĂ ÎN CURSUL
ONTOGENEZEI DESCENDENȚILOR ... .613
10. ARHITECTURA MATERIALULUI GENETIC ÎN SPERMATOGENEZĂ ... .615
11. ORGANIZAREA ADN ÎN NUCLEII SPERMATOZOIZILOR ... .617
12. FENOTIP CROMOZOMAL LAMPBRUSH A CROMOZOMUL Y DIN
SPERMATOCITELE PRIMARE DE LA DROSOPHILA HYDEI ... .617
13. CONDENSAREA ADN ÎN NUCLEII SPERMATOZOIZILOR ... .622
14. EVIDENȚIEREA CROMOZOMILOR DIN SPERMATOZOIZI ... .625
15. ETAPELE TEHNICII DE EVIDENȚIERE A CROMOZOMILOR
DIN SPERMATOZOIZI ... .628

CAPITOLUL XXI. CONSIDERAȚII GENERALE PRIVIND FENOMENUL DE AMPLIFICARE GENICĂ .629
(Lucian GAVRILĂ, Liliana BURLIBAȘA și Aurel ARDELEAN)
1. COMPLEMENTUL CROMOZOMAL ȘI REDUNDANȚA GENETICĂ .629
2. FAZELE CICLULUI CELULAR ȘI EVENIMENTELE CORESPONDENTE ACESTORA ÎN CAZUL AMPLIFICĂRII GENICE .630
3. DUBLU MINUSCULI ȘI REGIUNI OMOGEN COLORATE .633

CAPITOLUL XXII. CROMOZOMII POLITENI LA DIPTERE .637
(Lucian GAVRILĂ, Liliana BURLIBAȘA, Irina RADU, Letiția-Corina DAN și Daniela UȘURELU)
1. INTRODUCERE .637
2. ISTORIC .638
3. ORGANIZARE STRUCTURALĂ (MORFOLOGIE) .639
4. ORGANIZARE FUNCȚIONALĂ .650
5. TRANSCRIPȚIA ÎN CROMOZOMII POLITENI .652
6. CONTROLUL POLITENIEI .655
7. AMPLIFICAREA GENICĂ LA NIVELUL CROMOZOMILOR POLITENI ȘI ROLUL JUCAT DE CĂTRE ACEST MECANISM ÎN DIFERENȚIEREA CELULARĂ .656
8. POLITENIZAREA ÎN CONDIȚII PATOLOGICE .658

CAPITOLUL XXIII. CROMOZOMII URIAȘI LA CILIATE .659
(Lucian GAVRILĂ și Liliana BURLIBAȘA)
1. INTRODUCERE .659
2. MORFOLOGIA CROMOZOMILOR URIAȘI AI CILIATELOR .659

CAPITOLUL XXIV. CROMOZOMII POLITENI LA PLANTE .663
(Lucian GAVRILĂ, Liliana BURLIBAȘA, Aurel ARDELEAN, Irina RADU, Letiția-Corina DAN și Daniela UȘURELU)
1. INTRODUCERE .663
2. MORFOLOGIA CROMOZOMILOR POLITENI AI PLANTELOR .664
3. CROMOZOMII POLITENI LA PHASEOLUS .667
4. CROMOZOMII POLITENI LA TROPAEOLUM .670
5. CROMOZOMII POLITENI LA RHINANTHUS .671
6. CROMOZOMII POLITENI DIN CELULELE NODOZITĂȚILOR RADICULARE ALE LEGUMINOASELOR .672
7. CONCLUZII .676

CAPITOLUL XXV. EPIGENOMICA .677
(Natalia CUCU)
1. TERMINOLOGIA SPECIFICĂ DOMENIULUI EPIGENETICII .677
2. FENOMENE EPIGENETICE SAU INDEPENDENTE DE SECVENȚA ADN .680
3. SCURT ISTORIC AL CERCETĂRII EPIGENETICE .682
4. MECANISMELE MOLECULARE ALE METILĂRII ADN .686
5. ENZIMOLOGIA METILĂRII ADN .688

6. MECANISMUL MOLECULAR DE ACȚIUNE A ENZIMEI ADN METILTRANSFERAZA 689
6.1 SPECIFICITATEA DE REACtIE 689
6.2. SPECIFICITATEA DE SUBSTRAT 692
7. SIMETRIA SITUSURILOR METILATE ÎN DUBLA ELICE ADN 694
8. CONTROLUL REACȚIEI BIOCHIMICE DE METILARE A CITOZINEI 696
9. METILAREA ADN ȘI CANCERUL 697
10. ROLUL EPIGENETIC AL METILARII ADN ÎN CANCER 699
11. HIPOMETILAREA PROTOONCOGENELOR 701
12. HIPERMETILAREA GENELOR SUPRESOARE DE TUMORI 701
13. ROLUL GENETIC AL METILARII ADN ÎN CANCER 703

CAPITOLUL XXVI. IMPRINTING GENIC — IMPRINTING GENOMIC: MECANISME ȘI IMPLICAȚII ÎN PATOLOGIA UMANĂ 709
(Lucian GAVRILĂ și Aurel ARDELEAN)
1. INTRODUCERE 709
2. ARGUMENTE ÎN SPRIJINUL EXISTENȚEI FENOMENULUI DE IMPRINTING GENOMIC 714
3. IMPRINTING GENOMIC ÎN BOLILE EREDITARE UMANE 716
4. TRĂSĂTURI CARACTERISTICE GENELOR AMPRENTATE (IMPRINTATE) ȘI MECANISMELE IMPRINTING-ULUI GENETIC/GENOMIC 724
5. ROLUL ARN ÎN IMPRINTING 733
6. ASPECTE GENETICE ÎN EVOLUȚIA GENELOR AMPRENTATE 734
7. MODELE DE IMRINTING GENOMIC 736

CAPITOLUL XXVII. CÂTEVA MOMENTE REMARCABILE ÎN ISTORIA INACTIVĂRII CROMOZOMULUI X 743
(Lucian GAVRILĂ)
1. INTRODUCERE 743
2. ACTIVITATEA CROMOZOMULUI X ÎN CELULELE SOMATICE ȘI ÎN CELULELE GERMINALE 745
3. INACTIVAREA X ȘI DETERMINAREA SEXELOR 746
4. ANUL 1970 – PIATRĂ DE HOTAR ÎN DOMENIUL EMBRIOLOGIEI 746
5. ANUL 1980 – PIATRĂ DE HOTAR ÎN DOMENIUL TEHNOLOGIEI ADN RECOMBINANT 747
6. GENE CARE SCAPĂ INACTIVĂRII 748
7. ANII 1990 - CLONAREA CENTRULUI DE INACTIVARE 749
8. SEMNALUL DE BLOCARE 751
9. SEMNALUL DE ÎMPRĂȘTIERE (EXTINDERE) 752
10. INACTIVAREA CROMOZOMULUI X 753

CAPITOLUL XXVIII. RECOMBINAREA GENETICĂ 757
(Olivia POPA)
1. GENERALITĂȚI 757
2. RECOMBINAREA GENETICĂ LA VIRUSURI. 757
3. RECOMBINAREA GENETICĂ LA PROCARIOTE. 759

4. RECOMBINAREA GENETICĂ LA EUCARIOTE 766
5. CONVERSIA GENICĂ 773
6. RECOMBINAREA DE TIP V(D)J. 774
7. RECOMBINAREA NESPECIFICĂ SAU TRANSPOZIȚIONALĂ 777

CAPITOLUL XXIX. ALTERAREA STRUCTURII GENOMULUI:MUTAȚIILE EREDITĂȚII 781
(Lucian GAVRILĂ, Lorelai-Bianca GAVRILĂ și Valeria-Rosalinda GAVRILĂ)
1. GENERALITĂȚI 781
2. FACTORI MUTAGENI FIZICI 787
3. MUTAGENEZĂ CHIMICĂ 794
4. CONSECINȚELE BIOLOGICE ALE MUTAȚIILOR GENICE 805
5. BIOMUTAGENEZA—MUTAGENEZĂ BIOLOGICĂ 810
6. TRANSFORMAREA MALIGNĂ — TEORIA MUTAȚIONALĂ A CANCEROGENEZEI 810
7. MUTAGENEZA INSERȚIONALĂ 813
8. CONCLUZII 821

CAPITOLUL XXX. MUTAȚII DINAMICE 823
(Luis POPA)

CAPITOLUL XXXI. PROCES REPARATOR 831
(Lucian GAVRILĂ, Liliana BURLIBAȘA, Claudia HESSELMANN, Daniela, UȘURELU)
1. GENERALITĂȚII 831
2. LEZIUNILE ADN 834
3. MUTAȚIILE HOT-SPOTS 835
4. MECANISME DE REPARARE A LEZIUNILOR DIN ADN 836
    4.1. FOTOREACTIVAREA 836
    4.2. REPARAREA PRIN EXCIZIE 838
    4.3. SISTEMUL DE REPARARE A GREȘELILOR DE ÎMPERECHERE: 843
    4.4. REPARAREA POSTREPLICATIVĂ RECOMBINATORIE 844
    4.5. REPARAREA SOS 846

BIBLIOGRAFIA 851

PREFAȚĂ

Acum mai bine de 200 de ani, marele poet german J.W. Goethe, una dintre cele mai strălucitoare și enciclopedice minți pe care le-a produs umanitatea, un schizotimic care, în perioadele de liniște sufletească și mentală producea știință, iar în cele de frenezie a simțurilor producea poezie, a afirmat: „SPIRALA ESTE ESENȚA VIEȚII". Acum 50 de ani, J.D.Watson, și F.H.C. Crick au dăruit umanității cea mai mare descoperire a biologiei secolului XX și poate a tuturor timpurilor, demonstrând că acidul deoxiribonucleic (ADN) în care este înscris programul genetic al devenirii oricărei ființe vii are, într-adevăr, formă de spirală. Dar nu de spirală simplă, ci de dublă spirală. Astfel, structura bicatenară a ADN inițiază, la nivel molecular, miraculosul „joc de doi" al eredității, perechile de nucleotide din structura dublului helix ADN continuând în deslănțuirea acestui joc cu existența celor două catene complementare ale sale, apoi cu existența a două cromatide ale cromozomului metafazic, cu existența a doi cromozomi omologi în garnitura diploidă de cromozomi a organismelor, cu diferențierea a două sexe complementare și a două tipuri de gameți, din fuziunea cărora rezultă celula inițială sau zigotul, în care zestrea genetică a mamei se alătură zestrei genetice a tatălui, întru inițierea celui mai miraculos și fantastic eveniment al întregului univers – zămislirea unei ființe vii. În final, informația ereditară înscrisă în structura dublului helix ADN, inițiatoarea acestui joc de doi, conduce la apariția ființei umane, bunăoară, cu simetriile sale desăvârșite: doi ochi, două urechi, două nări, două buze. Ce frumos a încrustrat în nemuritoare versuri Lucian Blaga, miracolul naturii vii, fără a strivi *„corola de minuni a lumii"*! Și toate acestea, întru înțelepciunea fără margini a Naturii care, prin algoritmul redundanței dă speranță ființei vii să supraviețuiască, în condițiile în care, factori nocivi din mediu, permanent tulburători de linii … baudleriene (*…urăsc tot ce e zbucium tulburător de linii…*), ar distruge unul dintre elementele perechii normale: supraviețuirea este asigurată de prezența celui de al doilea element al perechii, întru nemurirea vieții.

De ce spirala este esența vieții? Pentru că s-a dovedit că și proteina are în fundamentul structurii sale elementare tot structură spirală. Descoperirea structurii în α-helix a catenelor polipeptidice i-a adus lui Linus Pauling laurii Premiului Nobel, pentru ca mai apoi, tulburătoarea sa activitate civică să-i aducă laurii Premiului Nobel pentru Pace.

Două macromolecule care constituie fundamentul materiei vii – acizii nucleici și catenele polipeptidice – prezintă deopotrivă structură spirală, evident fiecare cu specificul său. Dar, abia în zilele noastre se dă o explicație logică intuiției geniale a lui Goethe: într-o structură spirală pot fi incluse numeroase elemente, într-un spațiu restrâns. Înțelepciunea naturii a găsit patentul perfect pentru înmagazinarea unor informații ereditare din ce în ce mai complexe din cursul evoluției ființelor vii, de la cele mai simple sisteme autoreproducătoare – coacervatele, până la *„cel ce gândește singur și scormone lumina"* - Omul.

Descoperirea codificării genetice în cadrul căreia trinități de nucleotide din acizi nucleici fixează poziția aminoacizilor în catenele polipeptidice, acestea, la rândul lor, stând la baza edificării tuturor caracteristicilor ființelor vii, morfologice, fiziologice, biochimice și de comportament, a constituit, prin strădaniile din perioada 1955–1960 ale lui George Gamow, F.H.C. Crick, H.G. Khorana, Marshal Nirenberg și ale altora, una dintre cele mai importante străluminări în descifrarea secretelor vieții, pe baza căreia a fost elaborată paradigma centrală a biologiei moleculare, relația ADN-ARN-Proteine. Această relație constituie un veritabil „sistem nervos central" în funcționarea tuturor proceselor vieții și pornind de la ea a fost fundamentată întreaga gândire biologică modernă.

Descoperirea mecanismelor de reglare a activității genelor în dirijarea sintezei proteinice, datorată lui François Jacob și Jacques Monod, în anii 1960, a reprezentat un nou pisc în urcușul sisifian spre înțelegerea mecanismelor vieții, reluat de fiecare dată de la ultima mare descoperire, pentru că orice descoperire clarifică un aspect al miracolului vieții, ridicând numeroase alte întrebări, cărora li se vor da răspunsul în curgerea generațiilor.

Genele intră și ies din funcție, atunci când sunt create condiții propice corespunzătoare, raportate la nevoile organismului și împrejurările ambientale. În sistemele vii, totul se desfășoară cu o logică perfectă, în care hazardul și necesitatea fac casă bună întru conservarea structurilor și funcțiilor sistemului biologic și întru evoluția și perfecționarea acestora în cursul devenirii lumii vii, de-a lungul erelor geologice, spre triumful vieții.

Descoperirea reverstranscripției, în anul 1970, datorată lui H. Temin și lui D. Baltimore a reprezentat un moment de triumf al gândirii umane, care nu a fost niciodată zăgăzuită de dogme. Dogma centrală a biologiei moleculare – relația ADN-ARN-Proteine – nu primea, prin descoperirea faptului că și ARN poate fi matriță pentru sinteza ADN, „lovitura de grație" ci, dimpotrivă, o confirmare în plus, prin dezvăluirea naturii dialectice a viului și a caracterului cibernetic al construcției acestuia. Pe de altă parte, descoperirea reverstranscripției aducea o explicație cauzală mecanismului transformării maligne ce are la bază intervenția oncovirusurilor retrovirale și a lentivirusurilor, dintre care cel mai perfid s-a dovedit a fi HIV – agent al SIDA.

Anul 1970 a însemnat sinteza primelor gene și începutul manipulărilor genetice, consacrate în perioada 1973-1975, prin contribuțiile remarcabile ale lui Paul Berg și Stanley Cohen, în realizarea de himere moleculare. Tehnologia ADN recombinant a însemnat conferirea statutului de „doamnă de onoare" a științelor sfârșitului de secol XX și început de secol XXI și de mileniu III, pentru Genetica moleculară. Fizica avusese acest statut în anii 1940-1950, prin realizarea controlată a reacțiilor de fuziune și fisiune. Venise acum vremea Geneticii să strălucească. Pe fondul manipulărilor de gene, al construcției de himere moleculare și al transferului transpecific de gene, am fost martorii, în perioada 1970-1990 ai unor descoperiri de marcă, piatră de hotar în conturarea științei moderne despre ereditate. Astfel, a fost descoperit mozaicismul genelor care ne arată că genele sunt alcătuite din regiuni transcrise și traduse (*exoni*) și din regiuni transcrise, dar netraduse (*introni*), deopotrivă de importante în funcționarea genelor. A fost descoperit și faptul că unii introni se autoexcizează din transcriptul primar, ceea ce echivalează cu un fel de „harakiri" de nivel molecular. Această descoperire arăta în anii 1980 că unele molecule de acizi ribonucleici au funcție enzimatică - fiind numite *ribozime*.

În aceeași perioadă, a fost descifrată structura cromatinei, descoperindu-se *nucleosomii*. Totodată, au fost descoperite *protooncogenele* – gene normale care, prin produșii lor, se constituie în veritabili paznici ai integrității genomului și agenți de siguranță în desfășurarea normală a diviziunilor celulare. Mutația acestora declanșează desfășurarea unor diviziuni anormale, anarhice, cu instalarea stării de transformare malignă și declanșarea maladiei canceroase. Natura a inventat însă și *emerogene* adică *gene supresoare de tumori*, precum și gene implicate în cascada caspazelor care orientează o celulă „bolnavă" spre calea morții celulare programate genetic – *apoptoza*. Din nou, dialectica viului arată inteligența naturii și lupta neostoită a vieții cu moartea, scenariu scris cu litere moleculare pe răbojul structurii acizilor nucleici.

Geniul unei strălucitoare minți a Geneticii clasice – Barbara McClintock – care încă din anii 1940 identificase elementele genetice mobile la porumb, ce avea să fie numite *transpozoni* și identificate la aproape toate speciile – a fost recunoscut târziu, la 83 de ani, dar nici în știință nu este niciodată prea târziu să fie recunoscută valoarea. Ea demonstra că tinerețea și bătrânețea se confluează, atunci când este vorba de știință adevărată. „Bătrâna doamnă" a contribuit decisiv la conturarea imaginii moderne despre existanța unui genom dinamic, opusă aceleia de genom încremenit, static, rigid, care se conturase mai înainte.

„Jocul de-a transferul de gene" nu era însă un *„joc de-a vacanța"*, ci o mare cutezanță a geniului uman de a umbla la *„secretele sacre ale vieții"*, cu scopul vădit de a ameliora sau chiar a eradica, ceea ce până atunci medicina nu reușise, aceasta dovedindu-se a fi neputincioasă în fața bolilor ereditare. Astfel, a fost elaborată strategia înlocuirii de gene „rele" cu gene „bune", adică a *terapiei genice*. Prima ființă umană beneficiară a unui asemenea „joc" a fost o fetiță condamnată de zestrea sa genetică să trăiască „în balon", în totală izolare de lumea înconjurătoare, deoarece suferea de ADA, maladie ereditară care îi făcuse sistemul imunitar ineficient în lupta cu microbii. A fost primul triumf al terapiei genice aplicată la om. Medicina umană își croise drum fără întoarcere în universul Geneticii, devenind esențialmente o medicină genetică. Au început izolarea, secvențierea și clonarea de gene umane, legate de eredopatologii.

Și toate acestea au condus, în cele din urmă, consecință și a altor mari descoperiri, cum ar fi *reacția în lanț a polimerazei (PCR)*, la era **Genomicii**, deschisă înainte de anul 1990 cu proiecte simple, de descifrare a secvenței de nucleotide a unor sisteme primitive precum virusurile, apoi la bacterii, pentru ca, ulterior, să se treacă la descifrarea genomurilor primelor eucariote, culminând cu elaborarea, desfășurarea și finalizarea în 11 februarie 2001 a celui mai ambițios proiect științific al lumii contemporane – *Proiectul Genom Uman.*

Asemenea impresionantă cavalcadă a descoperirilor științifice din Genetica sfârșitului de secol XX, cu urcușurile și strălucirile sale, dar și cu unele zone de adumbrire, sunt prezentate în acest tratat, primul din lume, după cunoștințele noastre, care tratează exhaustiv, într-o abordare coerentă și unificatoare, organizarea, funcționarea și evoluția genomului, de la virusuri la om. Nu este de mirare că, în realizarea sa, au fost antrenate forțe redutabile ale Geneticii românești, în care, avem bucuria generatoare de optimism să constatăm că elementul tânăr este precumpănitor.

Tratatul nu trebuie să fie perceput ca fiind izvorât doar din cutezanță și ambiție, cât mai ales dintr-o necesitate de a oferi României, o lucrare de căpătâi, într-un domeniu de stringentă actualitate și de mare utilitate pentru întreaga omenire și totodată, de mare viitor.

Prof. Dr. Lucian Gavrilă

București, Octombrie 2003

CAPITOLUL I

EVOLUȚIA CONCEPȚIEI DESPRE GENĂ: DE LA INTUIȚIA NATURII CORPUSCULARE, CHIMICE, A FACTORILOR EREDITARI, LA DESCOPERIREA SUBSTRATULUI CHIMIC AL EREDITAȚII

1. INTRODUCERE ÎN CUNOAȘTEREA FENOMENULUI EREDITĂȚII

Gena reprezintă unitatea funcțională a eredității — proprietate primordială a materiei vii care i-a asigurat perenitatea, adică continuitatea din momentul constituirii primelor sisteme biologice — protobionții, cu aproximativ două miliarde de ani în urmă.

Noțiunea de genă a fost introdusă în anul 1909, de către botanistul danez Wilhelm Johannsen, ca sinonimie pentru termenul de factor ereditar, propus în anul 1865, de către Gregor Mendel-părintele Geneticii (Știința eredității și variabilității). Mendel a fost primul care a înțeles natura genei ca „factor particulat", adică corpuscul material care trece neschimbat de la părinți la descendenți. Tot Mendel a fost primul care a înțeles că pentru oricare caracter ereditar, factorul care îl determină trebuie să fie în dublu exemplar, pentru simplul motiv că la speciile care se reproduc pe cale sexuată, fiecare descendent provine din doi părinți și fiecare părinte transmite prin gametul său un factor ereditar pentru caracterul considerat. În procesul de fecundație are loc fuziunea gametului mascul cu gametul femel, rezultând zigotul. La nivelul zigotului, pentru fiecare caracter ereditar, factorul ereditar provenit de la tată se alătură factorului ereditar provenit de la mamă, constituindu-se astfel perechile de factori ereditari și sub această formă de pereche vor fi ei în toate celulele corpului. Aceasta deoarece, toate celulele corpului (celule somatice) provin prin diviziuni mitotice succesive ale zigotului, iar diviziunea mitotică se desfășoară astfel că se asigură păstrarea în celulele fiice a aceleiași cantități de material ereditar pe care l-a avut celula mamă. Când organismul ajunge la maturitate sexuală, celulele somatice ale țesutului fertil din gonade intră în diviziune meiotică spre a produce gameți — celulele reproducătoare. Meioza asigură separarea celor doi factori ereditari din fiecare pereche de factori ereditari, în cele două celule haploide rezultate, în urma primei diviziuni meiotice, fiecare dintre ele primind doar câte un singur cromozom din fiecare pereche de cromozomi și prin aceasta doar câte un singur factor ereditar din fiecare pereche de factori ereditari. Constanța comportamentului factorilor ereditari de-a lungul generațiilor, care asigură transmiterea cu fidelitate a caracterelor ereditare constatată de către Mendel, în celebrele sale experiențe de hibridizare, efectuate la mazăre, i-a sugerat minții sale geniale natura corpusculară a acestor factori ereditari. Aceasta înseamnă că factorii ereditari proveniți de la mamă și de la tată se asociază în zigot, constituind perechile de factori ereditari care dirijează realizarea tuturor caracteristicilor descendenților. Dar, chiar dacă au o natură corpusculară, fiind o substanță chimică, ei nu se amestecă ca într-o reacție chimică, spre a da un compus de reacție, devenind astfel altceva, ci își păstrează individualitatea, rămânând, de regulă, așa cum au fost ei în ascendență la părinți, la bunici, la străbunici etc. Astfel, pe lângă afirmarea naturii corpusculare a factorilor ereditari, Mendel a descoperit natura transmiterii caracterelor ereditare: caracterele ereditare nu se transmit direct de la părinți la descendenți, ca în concepția preformistă anaxagoreană, ci indirect, prin intermediul factorilor ereditari. Astăzi, ar fi absurd să gândim că un zigot ar putea avea „ochi albaștri", însă ne este clar faptul că în zigot sunt transmiși, printre ceilalți factori ereditari, și cel care în cursul dezvoltării embrionare va condiționa, în momentul strict programat, diferențierea în iris a celulelor care, prin distribuția specifică a pigmentului melanic, vor face ca ochii celui ce se va naște să fie albaștri. Putând exista sub cel puțin două forme alternative, **factorii ereditari se află sub formă de alele**. În perechea de factori ereditari care determină forma bobului la mazăre, se poate afla doar factorul ereditar care determină forma netedă sau doar factorul ereditar care deteremină forma zbârcită a acestuia. Prin natura morfologiei florii sale, mazărea se autopolenizează, astfel că mii de generații, soiul cu bob neted dă în descendență plante cu bob neted, pe când cel cu bob zbârcit dă în descendență totdeauna plante care fac boabe zbârcite. Doar mutația — fenomen rar, și care are natură întâmplătoare, afectând orice factor ereditar — poate transforma factorul ereditar care determină forma netedă în factorul ereditar care determină forma zbârcită a bobului de mazăre. De altfel, în istoria acestei specii, așa a și apărut, din tipul normal sau sălbatic, cu bob neted (AA), tipul mutant, cu bob zbârcit (aa).

Când Mendel a încrucișat însă soiul cu bob neted, cu soiul cu bob zbârcit el a constatat că boabele hibride din prima generație au forma netedă. Semănându-le și, de această dată, lăsând ca plantele să se autopolenizeze, cum o fac ele de când există această specie de plante, Mendel a constatat că în generația a doua (F2) în păstăi apar pe lângă pe lângă boabe netede și boabe zbârcite, în raport de 3:1. Astfel, Mendel a descoperit nu numai natura corpusculară a factorilor ereditari, care le permite să se păstreze ca entități de sinestătătoare, discrete, dar și calitatea lor de a fi dominanți sau recesivi. Mendel a considerat a fi dominant factorul ereditar care a determinat forma netedă a bobului, și s-a exprimat la plantele hibride din prima generație, pe cand acela care nu s-a manifestat (nu s-a exteriorizat, nu s-a exprimat in F1) adică acela care determină forma zbârcită a bobului l-a considerat factorul ereditar recesiv. Mendel și-a dat seama că acești factori ereditari au coexistat în boabele hibride din F1, pentru că din acestea au ieșit plantele celei de a doua generații, care au produs atât boabe netede cât și boabe zbârcite. Totodată, Mendel și-a dat seama că factorul ereditar recesiv nu se poate exprima în prezența factorului ereditar dominant. Factorul ereditar recesiv trebuie că se exprimă doar când în perechea de factori ereditari pentru forma bobului intră doar el, adică nu este în prezența factorului ereditar dominant. Cum poate ca el să ajungă să fie singur în pereche respectivă de factori, pentru forma bobului? Pentru a rezolva o asemenea problemă, mintea genială a lui Mendel a descoperit două fenomene esențiale în înțelelegerea fenomenului eredității, descoperire făcută pe când nu se știa nimic despre meioză și cromozomi! Astfel, Mendel a descoperit fenomenul de separare (segregare, disjuncție sau dezbinare) a factorilor ereditari la formarea gameților și unirea probabilistică a gameților de sex opus, în procesul fecundației. Acum se știe că segregarea factorilor ereditari se realizează în meioză, la formarea gameților, prin separarea cromozomilor omologi din bivalenți, cromozomi care vor migra la polii opuși ai celulei aflată în prima diviziune meiotică, astfel că un cromozom purtător al unui factor ereditar va migra într-o celulă fiică, pe când, omologul său, purtător al celuilalt factor ereditar al perechii, va migra în cealaltă celulă fiică ș.a.m.d.

Mendel mai are un merit excepțional în fundamentarea Geneticii ca știință și anume introducerea simbolurilor prin care a desemnat factori ereditari determinatori de caractere perechi sau alelomorfe, adică contrastante. Astfel, pentru că s-a dovedit a fi dominant, el a utilizat simbolul **A** pentru factorul ereditar care determină caracterul de bob neted, iar pentru cel care s-a dovedit a fi recesiv determinând caracterul de bob zbârcit, el a utilizat simbolul **a**. Mendel a mai constatat că sub aceeași înfățișare (fenotip), se exprimă structuri genetice diferite (genotipuri). Astfel, dacă genitorii sunt homozigoți **AA** (bob neted) și **aa** (bob zbârcit), plantele din F1 sunt heterozigote (**Aa**). În cursul meiozei acestor plante hibride (**Aa**) din F1, are loc separarea în gameți diferiți a factorului **A** și a factorului **a** astfel că vor rezulta în cursul microsporogenezei grăuncioarele de polen care, la germinare vor genera gameți masculi (spermatii) purtători ai factorului **A** și gameți masculi purtători ai factorului **a**. În macrosporogeneză (formarea sacului embrionar) vor rezulta oosfere cu factorul **A** și oosfere cu factorul **a**. Prin unirea, pe bază de probabilitate, a gameților de sex opus, purtători ai factorului **A** și purtători ai factorului **a**, vor rezulta în F2 organisme **AA** (25%), **Aa** (50%) și **aa** (25%). Structurile genetice **AA** și **Aa**, (75% dintre descendenții F2) se vor exprima ca bob neted, pe când structura genetică **aa** se va exprima ca bob zbârcit, de unde rezultă raportul de segregare de 3 dominant la 1 recesiv.

Cromozomii s-au dovedit a avea același comportament în meioză, ca factorii ereditari, de unde s-a dedus faptul dovedit experimental că factorii ereditari sunt localizați în cromozomi.

Întreg comportamentul factorilor ereditari mendelieni se bazează pe SEGREGARE (SEPARARE) LEGICĂ, **în meioză** și pe COMBINATORICĂ PROBABILISTICĂ, **în fecundație**. Numai un biolog cu o temeinică pregătire matematică putea înțelege aceste procese înainte de a se fi descoperit meioza și fecundația, iar acesta a fost Mendel!

În anul 1909, W. Johanssen a introdus noțiunile de genotip, pentru structura genetică, și de fenotip, pentru înfățișarea organismelor. Astfel, prin genotip (din limba greacă *gennao* însemnă a da naștere, a produce, a genera) se înțelege natura constituției genetice a unei celule sau a unui organism. Dacă o genă poate avea nu două, ci mai multe variante alelice, și în locul din cromozom pentru o asemenea genă se află una dintre variante, atunci genotipul acelui organism pentru acest locus este definit de varianta alelică în cauză. Acesta este un caz de polialelie. Un exemplu clasic de polialelie este cel al culorii ochilor de la *Drosophila melanogaster*, determinată de diferite alele $\mathbf{w^+}$ (roșu cărămiziu), $\mathbf{w^{co}}$ (corai), $\mathbf{w^{ch}}$ (cireșie), $\mathbf{w^{bl}}$ (sângerie), $\mathbf{w^{eo}}$ (eozin), $\mathbf{w^{i}}$ (ivoriu), **w** (alb) etc., toate aceste alele ocupând același locus genic și determinând variația culorii ochilor după cum se poate vedea. Într-o populație dată pot fi întâlnite toate combinațiile posibile ale variantelor alelice ale genei pentru culoarea ochilor dar, în structura unui individ intră oricare dintre aceste variante, numai că totdeauna ea este fie singură (cazul homozigoției AA sau aa) sau cel mult două (cazul heterozigoției Aa) una fiind localizată în locusul respectiv, dintr-un cromozom, cealaltă ocupând locusul corespondent, din cromozomul omolog al unei perechi de cromozomi. Alela $\mathbf{w^+}$ este dominantă asupra tuturor celorlalte alele din seria polialelă a culorii ochilor la *Drosophila*, pe când alela **w** este recesivă față de toate celelalte.

Școala lui Morgan a demonstrat că fiecare genă ocupă un anumit locus în cromozom și fiecare cromozom conține un șir linear de gene. Genele aflate în același cromozom se transmit în bloc la descendenți, deoarece cromozomul își păstrează, în condiții normale, integritatea structurală, atât în interfază cât și în cursul diviziunii celulare, el constituind o structură permanentă a celulei, capabilă de a conserva (prin replicare și transmitere de-a lungul nenumăratelor generații) informația ereditară a speciei în structura genetică a indivizilor care alcătuiesc o specie biologică. Acest proces de transmitere în bloc (înlănțuită) a genelor situate în locii genici diferiți ai aceluiași cromozom s-a numit **linkage**.

Școala lui Morgan a mai descoperit și fenomenul de schimb reciproc de gene între cromozomii omologi, schimb care s-a numit **crossing-over**. Acesta este un proces normal, fiziologic, realizat în cursul meiozei, când cromozomii omologi se împerechiază doi câte doi, formând bivalenți. Crossing-overul asigură diversificarea informației genetice la descendenți. Crossing-over-ul numit și recombinare genetică intracromozomală, alături de disjuncția independentă a perechilor de cromozomi, realizată tot în prima diviziune meiotică, asigură moștenirea de către descendenți nu a constelației de gene pe care au avut-o părinții sau bunicii, ci a unei noi constelații de gene existente la părinți și bunici și transmise de către aceștia în procesul reproducerii. Asemenea procese de variabilitate genetică au rol esențial în adaptabilitatea speciei la condiții variabile de mediu și au contribuit, alături de mutație — sursa primară a variabilității –, la evoluția speciilor, oferind diversificarea materialul genetic asupra căruia a acționat selecția naturală. Aceasta a ales și a promovat variantele care au dovedit fitnes-ul cel mai bun, adică a condiționat capacitatea adaptativă cea mai mare. Astfel, procesele genetice condiționează parametrii de evoluție ai speciilor biologice. Reproducerea tuturor ființelor vii este un proces eminamente genetic, în cadrul său manifestându-se deopotrivă cele două laturi inseparabile: ereditatea (continuul evolutiv) și variabilitatea (discontinuul evolutiv aducător de elemente de noutate, inovație).

Genetica clasică a evidențiat linkage-ul genelor. Analiza genetică a permis construcția hărții de linkage, stabilind în distanțe relative, date în procente de crossing-over, respectiv în unități de recombinare (centimorgani), locul ocupat de diferitele gene, în fiecare cromozom. Fiecare cromozom diferit din complementul cromozomal constituie substratul fizic al unui grup de linkage distinct.

Genele apar în hărțile genetice clasice, stabilite pe baza linkage-ului și crossing-over-ului precum mărgelele înșirate pe ață, ața reprezentând cromozomul. Într-o asemenea concepție, genele reprezintă unități funcționale în transmiterea caracterelor ereditare și totodată unități de recombinare și de mutație. Introducerea sistemului bacterie-bacteriofag în analiza genelor a permis evidențierea faptului că genele constituie unitate funcțională în dirijarea realizării unui anumit caracter ereditar și în transmiterea acestuia de-a lungul generațiilor, dar ea are subunități de recombinare (reconi) și de mutație (mutoni) care sunt de diferite dimensiuni, cele mai mici fiind perechea de nucleotide (Benzer, 1958). Ca și aranjamentul linear al genelor în cromozomi, subunitățile de mutație și subunitățile de recombinare ale genei au un aranjament linear. Gena, în calitatea sa de unitate funcțională, se mai numește **cistron**. Alelele a două gene lincate pot fi în poziție CIS, atunci când alelele dominante se află pe un același cromozom (A-B), pe când alelele lor recesive se află pe cromozomul omolog. (a-b). Când pe un cromozom, în locusul respectiv se află alela dominantă a unei gene, pe când gena lincată este reprezentată de alela recesivă (A-b și a-B) poziția este TRANS. Mutațiile intragenice au fost studiate, constatându-se dispunerea lor ca și mutațiile genice, în poziție CIS sau în poziția TRANS. Testele de complementație CIS-TRANS au permis să se elucideze statutul genei ca unitate funcțională în relizarea unui anumit caracter ereditar, de unde a derivat denumirea sa de cistron, pentru asemenea trăsătură.

Genetica biochimică a determinării pigmentației ochilor la *Drosophila melanogaster*, precum și a auxotrofiei la *Neurospora crassa* a atins apogeul în enunțarea relației dintre gene și enzime sub forma paradigmei „O GENĂ — O ENZIMĂ“, rafinată ulterior sub formularea „O GENĂ — O CATENĂ POLIPEPTIDICĂ“. Cu toate aceste pătrunderi excepționale în mecanismele moleculare ale proceselor metabolice dirijate de către gene, până în anul 1944, nu s-a știut nimic despre natura chimică a genei. Încă din anul 1869, anatomo-patologul elvețian de origine germană, Fr. Miescher descoperise în nucleii celulelor din puroi o substanță acidă bogată în acid fosforic, pe care a denumit-o **nucleină**. Ulterior, aceeași substanță a fost izolată din lapți de somon. Spre sfârșitul secolului al XIX –lea, celebrul chimist german Altman a denumit nucleina cu termenul de acid nucleic, identificându-se și structura sa de bază ca fiind o substanță macromoleculară — polimer de nucleotide — adică un polinucleotid. S-a evidențiat și structura nucleotidelor ca fiind alcătuite din baze azotate purinice și pirimidinice, pentoză și rest fosfat. Se stabilește existența a două clase primcipale de acizi nucleici, una din drojdia de bere (*Saccharomyces cerevisiae*) și numită **acid zimonucleic**, cealaltă extrasă din timus de vițel și numită **acid timonucleic**. Constatându-se ulterior că, în primul caz, pentoza este o riboză, pe când, în cel de al doilea, aceasta este o deoxiriboză, s-au standardizat denumirile de **acid ribonucleic**, redat prin acronimul **ARN** și **acid deoxiribonucleic**, redat prin acronimul **ADN**. În anul 1912, P. Levene enunță ipoteza tetranucleotidului, potrivit căreia macromolecula ADN este o înșiruire monotonă a patru nucleotide care conțin ca baze azotate adenina (A), guanina (G), citozina (C) și timina (T). Această ipoteză a influențat gândirea științifică timp de peste trei decenii, în sensul de a nu considera ADN ca material ereditar, substrat fizico-chimic al genelor, întrucât o asemenea însiruire monotonă AGCTAGCTAGCT etc nu ar fi putut explica enorma diversitate a genelor, respectiv a informației genetice, cerută de impresionanta diversitate de specii de viețuitoare existente în natură. Influența unei asemenea gândiri eronate a fost atât de mare, încât nici atunci când, în anul 1924, Feulgen și Rosenbeck dovediseră cu rigurozitate că ADN se află doar în cromozomi, nu și în citoplasmă, nu s-a acordat nici o atenție unui asemenea fapt, deși cromozomii fuseseră de mult implicați în ereditate ca purtători celulari ai genelor. Iar, în anul 1944, când O.T. Avery și colaboratorii săi au adus dovada peremptorie că ADN este materialul genetic al bacteriilor, nici chiar lui nu i-a venit să creadă, repetând de mai multe ori experiențele doveditoare și publicând rezultatele la insistențele tatălui său. J.D. Watson va denumi această descoperire a lui Avery **„bomba lui Avery“**. Era într-adevăr o „bombă științifică“, care avea să zguduie din temelii și să prăbușească falsa credință că proteinele, prin marea lor diversitate, ar fi substrat chimic pentru fenomenul ereditar.

Ulterior, ADN s-a dovedit a fi materialul genetic, substratul fizico-chimic al genelor nu numai la bacterii, dar și la virusuri, plante, animale și om. Paradigma ADN ca substrat fizico-chimic al eredității a fost una dintre marile izbânzi ale biologiei secolului al XX-lea.

2. DOVEDIREA ROLULUI GENETIC AL ADN ÎN EREDITATE

În anul 1928, efectuând cercetări în vederea obținerii de noi vaccinuri, prin injectare intraperitoneală de microbi în șoareci, medicul englez **W. Griffith** a descoperit fenomenul de TRANSFORMARE BACTERIANĂ, prin care pneumococi nevirulenți sunt transformați în pneumococi virulenți, atunci când se injectează asemenea pneumococi nevirulenți vii împreună cu pneumococi virulenți omorâți prin fierbere. Griffith a notat cu **R** tipul de pneumococ nevirulent și cu **S** tipul de pneumococ virulent. Simbolul S derivă de la **smouth** (neted, în limba engleză) deoarece acest tip de pneumococ (*Streptococcus pneumoniae*) prezentând capsulă, realizează pe mediu de agar colonii netede. Capsula este formată din poliglucide și se manifestă ca antigen. Cum poliglucidele prezintă variații, pneumococul virulent se prezintă și el sub diferite variante serologice care au fost notate cu S_I, S_{II}, S_{III}, acestea reprezentând, de fapt, niște variante polialelice, caracterul de virulență fiind un caracter ereditar. Prin mutație spontană, tipul S pierde capsula și se transformă în tip R care nu mai este nici virulent, acest tip de pneumococ realizând colonii cu contur neregulat sau rugoase, pe mediu de agar, de unde și simbolul R care derivă de la **rough**, adică rugos în limba engleză. Este foarte interesant faptul că în urma mutației, tipul S_I devine R_I, tipul S_{II} devine R_{II}, pe când tipul S_{III} devine R_{III}; niciodată prin mutație nu are loc schimbarea tipului de pneumococ de la o clasă la alta cum ar fi, bunăoară, de la S_I la R_{II} sau R_{III}, de la S_{II} la R_I sau R_{III} și de la S_{III} la R_I sau R_{II}. Caracterele de virulență — nevirulență sunt alternativele (alelomorfele) caracterului ereditar de infecțiozitate al acestei bacterii, comparabile cu alelomorfele neted-zbârcit ale caracterului de formă a bobului, din experiențele clasice ale lui Gregor Mendel.

Griffith nu a putut să explice mecanismul transformării bacteriene. El a dat o explicație speculativă: „într-un fel sau altul, pneumococii de tip R se transformă în pneumococi vii de tip S, în prezența resturilor pneumococilor de tip S“.

Transformarea nevirulenței în virulență era stabilă, pneumococii de tip R transformați în pneumococi de tip S în urma contactului cu „resturi" ale pneumococilor de tip S dând în descendență pneumococi de tip S. Cu alte cuvinte, aceste „resturi" ale pneumococilor de tip S reușeau să transforme definitiv caracterul ereditar de nevirulență în caracterul ereditar de virulență din care cauză, curând după descoperirea sa, în anul 1944, procesul de transformare bacteriană avea să se numească TRANSFORMARE GENETICĂ, mai ales că el a fost evidențiat nu numai la pneumococi și la alte bacterii, dar la multe alte grupe de viețuitoare, micoorganisme, plante, animale și om.

Până în anul 1944, au mai fost unele reluări ale experiențelor lui Griffith, toate confirmând rezultatele acestuia, din anul 1928, unele dintre ele realizând și teste enzimatice prin care au fost excluse ca agent transformant poliglucidele capsulei și proteinele.

În anul 1944, O.T. Avery, Mac Cloud și Mc Carthy, de la Institutul Rockefeller din S.U.A. au avut ideea genială de a extrage ADN din tipul S_{II}, pe care l-au purificat foarte riguros, pentru a nu rămâne contaminanți (glucide, lipide, proteine) și l-au introdus în mediul de cultură al bacteriilor de tip R_{III}, lăsând bacteriile în prezența ADN pentru 24 de ore, la 37 ^{0}C. Analizând cultura bacteriană crescută pe mediu agar, acești autori au constatat un lucru extraordinar: printre coloniile de bacterii de tip RIII apăruseră și unele colonii cu bacterii de tip S_{II} vii! Aplicarea testelor enzimatice au exclus intervenția proteinelor sau glucidelor într-o asemenea transformare. Analiza mutației a exclus posibilitatea apariției bacteriilor S_{II} din bacterii R_{III}, pentru că niciodată nu are loc mutația de reversie R în S, ci numai mutația directă S în R. În plus, mutația nu schimbă tipul serologic, ci doar caracterul de virulență în nonvirulență, mutația fiind un eveniment rar, pe când frecvența cu care apăruseră bacteriile virulente din bacterii nevirulente depășea cu mult rata de mutației spontane (1/100.000/per genă/per generație). Astfel, toate aceste argumente au lăsat posibilitatea unei singure explicații pentru apariția tipului S din tipul R: ADN ESTE AGENT TRANSFORMANT, DEȚINÂND ÎN STRUCTURA SA INFORMAȚIA EREDITARĂ PENTRU CARACTERUL DE VIRULENȚĂ-NEVIRULENȚĂ. Cu alte cuvinte, ADN este substratul chimic al eredității, materialul genetic al celulei. O asemenea descoperire, numită de către J.D. Watson „Bomba lui Avery" era într-adevăr o „bombă" științifică, spărgând pentru totdeauna încremenirea ideii generate de ipoteza tetranucleotidului lui Levene potrivit căreia acizii nucleici nu pot fi substanța ereditară, deoarece în structura lor, cele patru deoxiribonucleotide se succed într-o ordine fixă, monotonă (AGTCAGTCAGTC etc.) negeneratoare de informație ereditară specifică fiecărei specii. Dimpotrivă, cei mai mulți oameni de știință erau încredințați că proteinele, având o variație considerabilă a succesiunii de aminoacizi, pot oferi posibilități nelimitate de înscriere în structura lor a informației ereditare caracteristică pentru fiecare specie. Pe un astfel de fundal de gândire dogmatică, potrivit căreia proteinele sunt materialul ereditar al celulei, a afirma și a demonstra că dimpotrivă, ADN este substanța care îndeplinește un asemenea rol, era într-adevăr „o bombă".

La scurt timp, sunt aduse noi dovezi care confirmă rolul de material genetic al ADN la alte genuri de bacterii, apoi la drojdii, la plante, animale și om. ROLUL DE MATERIAL GENETIC AL ADN DEVINE UNA DINTRE CELE MAI IMPORTANTE PARADIGME/AXIOME ALE BIOLOGIEI MODERNE. Pentru această descoperire, O.T. Avery ar fi trebuit să primească Premiul Nobel. Demersurile pentru atribuirea acestui premiu au tergiversat, fiind împiedicate de problemele legate de încheierea Celui de al Doilea Război Mondial, astfel că, una dintre cele mai mari descoperiri din secolul XX, în domeniul biologiei, a rămas, pe nedrept, ca orice altă descoperire, fără încununarea autorului cu laurii Premiului Nobel.

Descoperirea altor fenomene, urmare a introducerii în cercetare a modelului bacterie-bacteriofag a adus și alte dovezi în sprijinul rolului genetic al ADN, printre care conjugarea bacteriană, transducția și sex-ducția, în toate cazurile dovedindu-se că orice fragment de ADN transferat de la o celulă la alta cu ajutorul fagilor transductanți (transducție) sau a factorului de fertilitate recombinant (F'), în cazul sex-ducției, este purtător de informație genetică și capabil de a se integra prin crossing-over în cromozomul celulei gazdă, determinând la aceasta apariția de noi caractere ereditare, cum ar fi bunăoară trecerea de la auxotrofie la prototrofie.

Marcajul radioactiv al proteinei cu ^{35}S și al ADN cu 32p a permis lui Hershey și Martha Chase să demonstreze că în celula gazdă bacteriană, în timpul ciclului litic al bacteriofagilor, pătrunde doar ADN fagic, capsida fagică, alcătuită din proteine fagice, rămânând în afara celulei gazdă, ca „fantomă fagică". Și totuși, la sfârșitul ciclului litic sunt produși fagii maturi (virioni) alcătuiți deopotrivă din ADN fagic și proteină fagică. De aici, s-a tras concluzia că ADN fagic deține informația ereditară atât pentru propria sa reproducere, cât și pentru dirijarea sintezei proteinelor fagice, ceea ce este și de așteptat de la o substanță ereditară care trebuie să îndeplinească cele două funcții inseparabile: funcția autocatalitică (replicarea) și funcția heterocatalitică (dirijare de sinteze de catene polipeptidice sau de alte biomolecule).

Analiza efectului radiației UV a permis să se evidențieze faptul că radiația UV cu lungimea de undă cuprinsă între 2 600Å și 2800Å determină cea mai mare frecvență de apariție a mutațiilor genice, dar tocmai această lungime de undă reprezintă spectrul de absorbție maximă a razelor UV de către ADN. O asemenea constatare susținea ideea că genele se identifică cu ADN, reprezentând segmente bine definite ale acestei macromolecule, fiecare deținând în secvența sa de nucleotide informația ereditară care dirijează manifestarea unui anumit caracter ereditar.

În plus, s-a constatat că în ciclul celular se înregistrează o variație cantitativă desfășurată după un pattern foarte precis: dublare la debutul diviziunii (4C) și revenirea la cantitatea diploidă (2 C), tipică fiecărei specii, la sfârșitul diviziunii, respectiv în celulele-fiice. Un asemenea pattern al variației cantitative este caracteristic doar ADN, pe când celelalte componente macromoleculare ale celulei, incluzând ARN celular, prezintă un model foarte neregulat al variației cantitative în decursul ciclului celular. Urmărirea marcajului radioactiv de-a lungul mai multor generații celulare a constatat că acesta rămâne permanent în ADN (funcție însă de timpul de înjumătățire al trasorului radioactiv), pe când în ARN și proteine, radioactivitatea dispare, ceea ce denotă faptul că structura ADN este o structură stabilă, perenă — cerință obligatorie pentru ca o substanță să poată funcționa ca deținătoare de informație ereditară, ca substrat chimic, material, al eredității —, pe când proteinele și ARN celular suferă un turn-over permanent, fiind sintetizate îndeplinindu-și rolurile celulare, după care are loc hidroliza lor. Toate aceste date nu au făcut decât să confirme ceea ce, la început a fost „bomba lui Avery", pentru ca apoi să devină o AXIOMĂ A BIOLOGIEI: ADN ESTE SUBSTRATUL FIZICO-CHIMIC AL EREDITĂȚII, ÎN TOATE SISTEMELE SUPRAMOLECULARE NECLEOPROTEINICE, DE LA VIRUSURI LA OM.

Existența unui grup de virusuri care au în miezul lor de acid nucleic doar ARN viral a ridicat problema cine îndeplinește rol de material genetic, în acest caz. Dovezi experimentale irefutabile au demonstrat că, în cazul ribovirusurilor, ARN viral joacă rol de material ereditar. Două echipe de cercetători, Fraenkel-Conrat și Williams, în SUA, și Gierer și Schram, în Germania, au dovedit independent unii de ceilalți, rolul genetic al ARN viral, extras din virusul mozaicului tutunului (VMT). ARN viral, înalt purificat, injectat în plantule sănătoase de tutun, determină apariția unor pete caracteristice pe frunzele de tutun care apar mozaicate (pete galbene, acolo unde se dezvoltă virusul, alternează cu pete verzi, acolo unde nu se dezvoltă virusul, conferind frunzei un aspect mozaicat, de unde și denumirea virusului). Din petele galbene, apărute în locul unde a fost injectat ARN viral, se pot izola virioni VMT, adică virusuri mature, alcătuite atât din ARN viral cât și din proteine virale, asamblate în capsida virală. De aici, s-a dedus că ARN viral deține informația genetică nu numai pentru propria sa reproducere (replicare) ci și pentru dirijarea sintezei de proteine virale, ceea ce constituie tocmai o proprietate cerută unei substanțe pentru a îndeplini rolul de material genetic. Atunci când se injectează în plante tinere, sănătoase, doar proteina virală, se constată că nu mai apar petele caracteristice pe frunze, de unde s-a dedus că proteina virală nu poate îndeplini rol de material ereditar. Astfel, s-a conchis că doar ADN la toate sistemele supramoleculare (de la virusuri la om) și ARN viral, la ribovirusuri, pot îndeplini funcția de material genetic, constituind substratul fizico-chimic al eredității. Dar, dovedirea doar a rolului genetic al acizilor nucleici (ADN și ARN viral) nu era suficientă pentru a se descifra natura miraculoasă a genei. În primul rând, această descoperire nu putea da răspuns la cea mai misterioasă proprietate a genelor și anume aceea de a se reproduce în forme identice, spre a se transmite de la părinți la descendenți și spre a asigura astfel continuitatea vieții de-a lungul sutelor de milioane și miliarde de ani. În al doilea rând, ea nu explica nici modul în care gena dirijează realizarea caracterului ereditar, în organismul în a cărui structură genetică se află gena considerată.

Marele microbiolog și genetician american Max Delbruck era foarte preocupat de prima problemă, aceea a misterului autoreproducerii genei. Dacă s-ar fi elucidat această problemă, s-ar fi clarificat și problema autoreproducerii sistemelor biologice, cu tot corolarul de interpretări din jurul unei asemenea proprietăți definitorii pentru fenomenul vieții. Delbruck i-a propus tânărului său colaborator J. D. Watson să preia această problemă. Trecând oceanul, J.D. Watson vine în Europa și poposește mai întâi în Copenhaga, iar mai apoi, în Anglia, la Cambridge. Aici, în laboartorul de Biologie moleculară de la Trinity College, îl întâlnește pe F. H. C. Crick, eminent molecularist, cu care abordează problema structurii ADN. Se știa care este compoziția ADN, se știa câte ceva despre înșiruirea nucleotidelor în catene polinucleotidice. În plus, Todd și colaboratorii săi reușiseră între 1948 și 1952 să realizeze sinteza in vitro a unui dinucleotid, pentru care va lua Premiul Nobel, dar aceste cunoștințe nu se legau într-un sistem coerent care să explice cum poate ADN să-și îndeplinească prin structura sa capacitatea de substrat fizico-chimic al genei, respectiv al eredității.

În perioada respectivă, două direcții de cercetare s-au dovedit a fi decisive în atingerea obiectivului pentru care J.D. Watson venise în Europa. Una dintre acestea era aceea a cercetărilor de cristalografie asupra soluțiilor sărurilor de ADN, abordată în laboratorul condus de M. Wilkins, din Londra, la King's College și în care Rosalind Franklin obținuse cele mai clare fotografii ale difracției în raze X ale acestor soluții de ADN. Din aceste fotografii reieșea clar că macromolecula ADN are o structură înalt ordonată, cu periodicitate riguroasă a sa și în care apăreau elemente de duplicitate și spiralizare. Aceste fotografii oferite de R. Franklin luiWatson și Crick se vor dovedi decisive în propunerea modelului structurii în dublu helix a ADN de către aceștia.

A doua direcție de cercetare va fi reprezentată de cromatografia hidrolizatelor macromoleculeor de ADN, direcție condusă de biochimistul american de origine austriacă E. Chargaff. Aceste cercetări au dovedit că bazele azotate purinice și pirimidinice sunt prezente în cantități echimolare în ADN provenit de la cele mai diferite specii, doar că fiecare specie are propria sa secvență de baze azotate în ADN-ul său, distinctă de aceea întâlnită în ADN la toate celelalte specii. Aceasta a condus la conceptul de informație genetică definită ca succesiune de baze azotate în macromolecula ADN. Din aceasta decurgea următoarea problemă: cum poate secvența de baze azotate din macromolecula ADN să determine secvența de aminoacizi din catenele polipeptidice și, pe această cale să determine manifestarea unui anumit caracter ereditar. Chargaff a mai constatat că în ADN care provine de la diferite specii, indiferent de cantitățile în care se află fiecare bază azotată, proporția molară de G este totdeauna egală cu proporția molară de C, iar proporția molară de A este egală cu acea de T. Aceste constatări după care A=T, T=A, G=C, C=G, pe când, $A+T/G+C \neq 1$, la toate speciile, iar G+C este variabil, între 26% și 74%, pentru diferite specii, constituie așa numitele legi ale lui Chargaff.

Și densitatea ADN a sugerat că macromolecula ADN conține două catene polinucleotidice. Aceste date au fost utilizate de J.D. Watson și F. H.C. Crick, în elaborarea modelului de structură bicatenară a ADN. Înțelegând poate mai mult decât cei care obținuseră cu sudoarea minții și efortul lucrului în laborator semnificația acestor date, Watson și Crick au utilizat tehnica aplicată odinioară cu atâta succes de către Linus Pauling, prin care a descoperit modelul de structură în α- helix a proteinelor și pentru care acesta primise Premiul Nobel, și anume tehnica modelării chimice. În laboratorul de mecanică de la Trinity College, cei doi au comandat modele pentru toate componentele chimice ale macromoleculelor ADN și au început o cursă contra cronometru pentru realizarea modelului de structură a ADN. Fotografiile de difracție în raze X ale ADN, obținute de R. Franklin, în laboratorul lui Wilkins, din Londra și legile lui Chargaff conduceau indubitabil la ideea unei structuri bicatenare, bazate pe împerecheri de baze azotate de tip A-T, T-A, G-C, C-G. Complementaritatea bazelor azotate purinice și pirimidinice decurgea organic din legile lui Chargaff. Peste ocean, în California, L. Pauling lucra la un model ADN, în același timp. Întâmplarea a făcut ca acesta să-i trimită fiului său, aflat în acea perioadă la Trinity College, o scrisoare în care îi reda draftul unui model al ADN cu structură tricatenară. Erori elementare de legături chimice îl deturnaseră pe acest celebru chimist să ajungă la a doua mare descoperire a vieții sale. Întâmplător sau nu, Watson a văzut schița acestui model, și dintr-o dată și-a dat seama că este eronat și că modelul lor, plămădit cu chinurile minții, dar construit și cu mâna, cu ajutorul împerecherilor de baze modelate, în laboratorul mecanic, este cel care explică modul în care gena se poate autoreproduce. Astfel, Watson și Crick au publicat în luna Februarie a anului 1953, în revista londoneză „Nature", modelul de structură dublu helicală a ADN care a rămas cea mai mare descoperire a biologiei secolului al XX-lea. Complementaritatea celor două catene polideoxiribonucleotidice și spiralizarea ordonată, periodică erau elementele definitorii ale modelului. Unite prin punți de hidrogen cele două catene se puteau ușor separa spre a funcționa ca matrițe pentru sinteza de catene complementare, asigurând astfel reduplicarea macromoleculei inițiale, reacție primordială între reproducerea ființei vii în forme identice. Un model simplu care dădea răspuns la marile mistere ale vieții: cum se reproduce aceasta în forme identice și cum se transmit cu fidelitate caracterele ereditare de la părinți la descendenți. În plus, modelul putea demonstra cum poate informația ereditară, înscrisă în macromolecula ADN, sub forma unei secvențe de nucleotide, să dirijeze sinteza de catene polipeptidice cu anumită secvență de aminoacizi și prin aceasta cum pot fi exprimate diferitele caractere ereditare. Pe de altă parte, același model putea demonstra modul în care, prin mutație, poate fi modificată informația ereditară din ADN și pot apare la descendenți caractere ereditare diferite de cele ale părinților.

Toate acestea au condus la elaborarea dogmei centrale a biologiei moleculare, redată inițial sub forma ADN⟶ARN⟶Proteine. Era sfârșitul ÎNCEPUTULUI. Genetica moleculară nu mai era la începuturi, ci în plină epocă de mari descoperiri.

3. ASPECTE ALE STRUCTURII CHIMICE ȘI FIZICE A ADN

Analiza compoziției în baze azotate a ADN din diferite surse l-a condus pe Chargaff la descoperirea unor reguli care au fost numite legile lui Chargaff, potrivit cărora există raporturi echimolare între purine și pirimidine. Iată compoziția chimică ADN de la diferite specii:

Sursa din care s-a extras ADN	Proporția în			
	Adenină	Timină	Guanină	Citozină
Om (spermă)	31,0	31,5	19,1	18,4
Somon (lapți)	29,7	29,1	20,8	20,4
Arici de mare	32,8	32,1	17,7	17,7
Drojdie de bere	31,7	32,6	18,8	17,4
Mycobacterium tuberculosis	15,1	14,6	34,9	35,4
Escherichia coli	26,1	23,9	24,9	25,1
Virusul Vaccina	29,5	29,9	20,6	20,3
Bacteriofagul T_2 de *E. coli*	32,6	32,6	18,2	16,6*

*5 — hidroximetilcitozina

În LEGILE LUI CHARGAFF își are izvorul ideea împerecherii bazelor purinice cu bazele pirimidinice — ideea ce a constituit piatra de temelie în elaborarea de catre J.D,Watson și FH.C.Crick a modelului de structura secundară, bicatenară a ADN.

Raportul A+T / G+C este diferit de unitate și este specific fiecarei specii, fiind mult mai apropiat la organismele înrudite filogenetic.

Iată câteva valori ale raportului A+T/G+C:

Organisme	**Valori ale raportului A+T/G+C**
Bacteriofagul lambda	1,06
Bacteriofagul T2	1,84
Pseudomonas aeruginosa (bacterie)	0,51
Escherichia coli (bacterie)	0,97
Saccharomyces cerevisiae (drojdie)	1,80
Aspergillus niger (ciuperci ascomicete)	1,00
Triticum aestivum	1,22
Locusta migratoria	1,41
Gallus domestica	1,36
Equus cabalus	1,33
Homo sapiens	1,40

Sintetizând în mod magistral aceste date în domeniul biochimiei acizilor nucleici, acumulate în literatura de specialitate, bazați și pe experiențe proprii, incluzand modelarea moleculara, în anul 1953, James Dewey Watson si Francis Harry Camoton Crick, de la Trinity College, din Cambridge (Anglia) au propus MODELUL DE STRUCTURĂ BICATENARA A ADN (fig.1), care a fost unanim acceptat și considerat cea mai mare descoperire din domeniul biologiei, în secolul XX, si una dintre cele mai mari în istoria științei, pentru care autorii au primit Premiul Nobel, în anul 1962, împreună cu M.H.F.Wilkins de la King's College, din Londra.

Înainte de elaborarea modelului Watson-Crick de structură bicatenară a ADN, L.Pauling si Corey, propuseseră un model tricatenar ce s-a dovedita fi eronat, deoarece bazele azotate în cadrul său fiind dispuse la exterior si în care nu existau forțe care să-i asigure stabilitatea structurii triplu-catenare, iar unele distante **van der Waals** erau prea mici față de cele calculate (Watson si Crick, 1953). De asemenea, Watson si Crick au adus argumente si împotriva modelului tricatenar propus în același timp de către Fraser. In elaborarea modelului dublului-helix, Watson si Crick au ținut seama și de sfaturile lui Jerry Donohue — un excelent

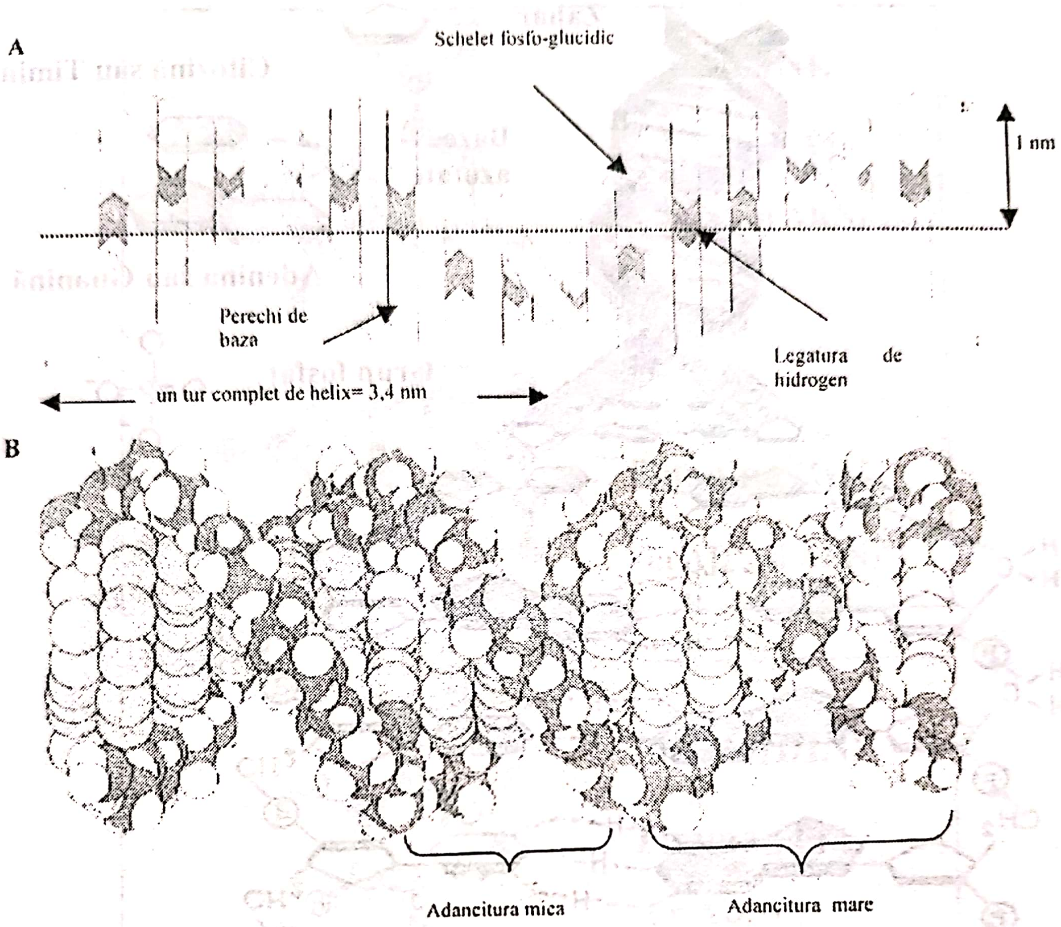

A
Schelet fosfo-glucidic
1 nm
Perechi de baza
Legatura de hidrogen
un tur complet de helix= 3,4 nm
B
Adancitura mica
Adancitura mare

Fig. 1 — Structura ADN
A. Constantele fizice dimensionale ale dublului helix ADN
B. Modelul molecular spațial al dublului helix ADN.

cunoscător al principiilor cristalografiei. Totodată ei s-au bazat pe fotografiile privind difractia în raze X a ADN, puse la dispozitie de Rosalind E. Franklin si realizate în laboratorul din Londra al lui Wilkins.

Modelul de structură bicatenară a ADN, propus de Watson si Crick, admite că macromolecula de ADN este formată din doua helixuri coaxiale, circular cilindrice, adică din doua catene polinucleotidice paralele, înfășurate plectonemical (relațional) între ele, după generatoarea unui cilindru virtual. Una dintre aceste două catene are direcție ascendentă, în care nucleotidele se leagă prin punți fosfodiesterice — legături intracatenare — de la C3' la C5', (fig. 2), iar cealaltă catenă are directie descendentă, deoarece în ea nucleotidele se leagă prin punți

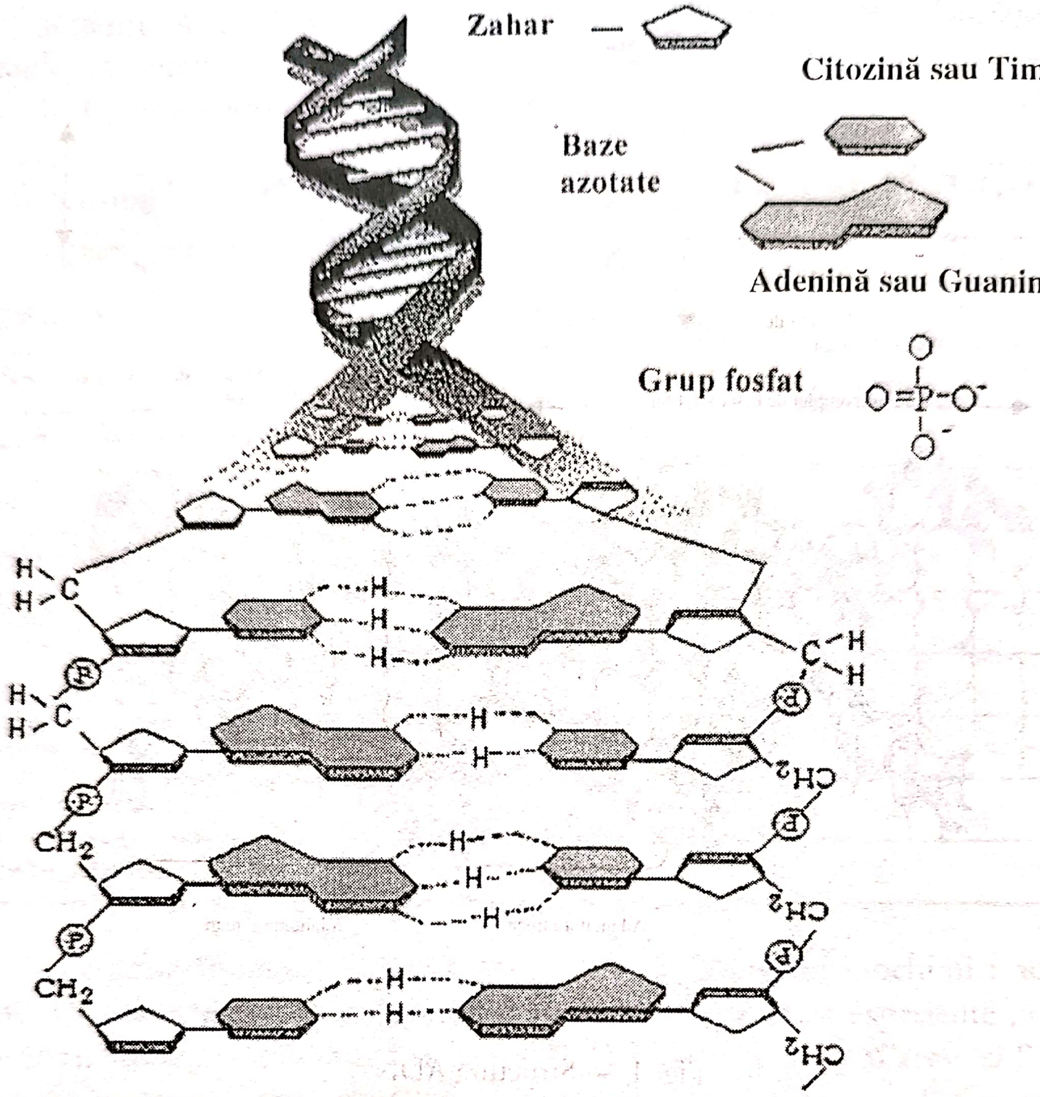
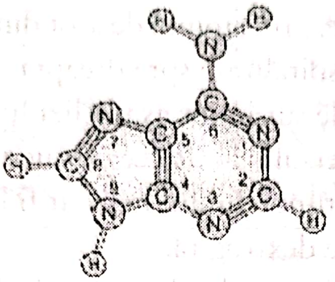


Fig. 2 — Structura secundară a ADN.

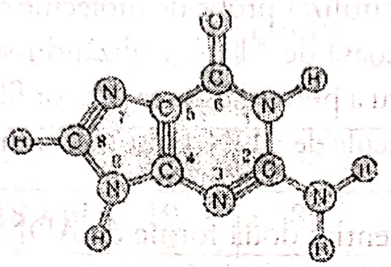
fosfodiesterice cu orientare de la C5' la C3'. Cele două catene polinucleotidice sunt așadar antiparalele. Structura bicatenară helicală a ADN face ca el să mai fie numit DUBLU-HELIX ADN. Datorită răsucirii plectonemicale în spirală, a celor două catene, structura secundara a ADN mai este numită și STRUCTURĂ DUBLU HELICALĂ. Răsucirea celor două catene ale dublului helix ADN este dextrală, spre dreapta, și în toate sistemele biologice se întâlnește acest tip de spiralizare spre dreapta, astfel că, în mod normal, ADN este dextral. Bazele azotate se află spre interiorul dublului-helix, pe când grupările fosfat sunt dispuse la exterior, unind deoxiribozele nucleotidelor învecinate prin legături covalente puternice, fosfodiesterice, intracatenare, alcătuind o veritabilă coloană glucido-fosforică. Bazele

PURINE



Adenina (A)

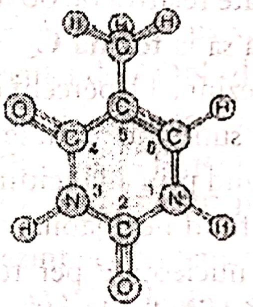
(în ADN și ARN)



Guanina (G)

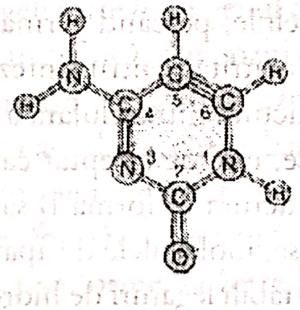
(în ADN și ARN)

PIRIMIDINE



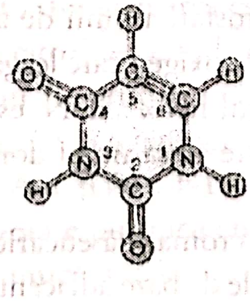
Timina (T)

(în ADN)



Citozina (C)

(în ADN și ARN)



Uracil (U)

(în ARN)

inv. 158020

azotate sunt atașate la carbonul C1 al deoxiribozelor și anume: pirimidinele prin atomul de azot din pozitia 3', iar purinele, prin atomul de azot din pozitia 9. Dublul helix ADN este un helix dextrogir, cu spiralizare spre dreapta. Aceasta înseamnă că atunci când un observator privește de sus în jos axa helixului în orice directie, fiecare catenă are un traiect în sensul mersului acelor ceasornicului. Daca traiectul ar fi în sens opus acelor de ceasornic, atunci dublul helix ar fi levogir (spiralizare de stânga). ADN nativ are o spiralizare dextrogiră.

Studiile de difracție în raze X au utilizat probe de molecule de ADN orientate, obținute dintr-o soluție foarte vâscoasă de ADN, realizându-se cu ele o peliculă asemănătoare unui gel fibrilar. Pentru a preveni uscarea acestor fibre și dezorientarea lor, această peliculă fibrilară de molecule de ADN a fost menținută într-o atmosferă cu umiditate mare.

In asemenea condiții, s-au evidențiat două forme de ADN:

La 75% umiditate relativă, ADN apare sub **forma A**;

La 92% umiditate relativă, ADN apare sub **forma B**;

Când solutia de ADN are o umiditate relativă de 66% și o concentrație salină (NaCl sau LiCl) foarte mare, molecula sa ia **forma C.**

Forma A a dublului helix ADN prezinta 11 perechi de nucleotide per tur de helix și planurile perechilor de baze sunt îndepărtate cu 20° față de planul perpendicular la axa helixului, axa trecând prin adâncitura mare a dublului-helix, care este foarte clara, adâncitura mică fiind neglijabilă;

Forma B prezinta 10 perechi de nucleotide per tur de spirală, iar planul perechilor de baze este perpendicular pe axa helixului. Forma B reprezintă structura „clasica" Watson-Crick, prezentă în celule, pe când forma A este caracteristică ipostazei în care ADN funcționeză ca matriță pentru sinteza ARN.

Daca se admite că forma B este structura intracelulară a ADN, cum în celula ADN este asociat cu proteine specifice, este de așteptat ca la nivelul regiunilor de legare a proteinelor, modelul de structura în forma B să fie modificat.

Cum si în celule există soluții apoase, moleculele de apă se află în vecinătatea celor mai multi atomi susceptibili de a stabili legături de hidrogen și anume atomii de hidrogen liberi ai fiecărei grupări fosfat, atomii de azot și de hidrogen de la marginea perechilor de baze și atomii de oxigen care leagă atomi de fosfor la restul scheletului. Din această cauză, dublul-helix ADN este acoperit de un strat monomolecular de apă, la care se poate atașa un al doilea strat monomolecular de apă.

Forma C a ADN este întâlnită în cromatina eucariotelor și se caracterizează printr-o distantă de 3,1 Å între perechile de baze adiacente și prezintă 10,5 perechi de baze per tur complet de spiră.

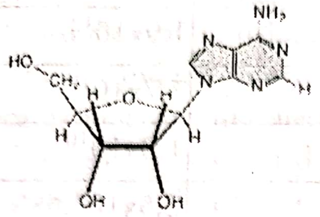
Sursa	**Dimensiunea în perechi de baze (pb)**	**GM**
Mamifere	3,0x10^{9}	1,9x10^{12}
Drosophila melanogaster	1,2x10^{8}	7,7x10^{10}
Saccharomyces cerevisiae	1,6x10^{7}	1,0x10^{10}
Escherichia coli	4,0x10^{6}	2,5x10^{9}
Fag T2 de *E. coli*	4,0x10^{5}	1,3x10^{8}
Fag λ de *E.coli*	48.414	1,3x10^{7}
Plasmidul pBR 322	4.363	2,8x10^{6}
Plasmidul pUC 18 / pUC 19	2.686	1,7x10^{6}

Lungimea acestor molecule de ADN poate fi obtinută prin relatia:
1 µm = 2 x 10^{6} unități de greutate moleculara.

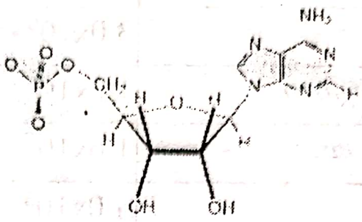
Moleculele din tabelul de mai sus variază deci între 0,7 µm și 40.000 µm lungime. Lățimea moleculei de ADN (diametrul) este de 20 Å = 0,002 µm .

Ce stă la baza structurii bicatenare a ADN? Realizarea structurii bicatenare este consecinta COMPLEMENTARITĂTII DINTRE BAZELE AZOTATE PURINICE SI BAZELE AZOTATE PIRIMIDINICE. Prin proprietățile sale structurale, adenina prezinta complementaritate fată de timina, astfel că, atunci când intră în structura ADN, adenina se unește cu timina, prin intermediul a două punți de hidrogen între hidrogenul din gruparea NH_2 extrainelară al adeninei și oxigenul din gruparea C=O, din poziția 6 a timinei, iar a doua, între hidrogenul din gruparea intrainelară NH_2, din poziția 1 a timinei, și azotul din pozitia 1 al adeninei. Se formează astfel perechi de baze azotate A=T sau T=A. Pe de altă parte, guanina prezintă complementaritate fată de citozină cu care se uneste în cadrul structurii bicatenare, formând perechi CG sau GC, prin intermediul a trei punti de hidrogen. Acestea se formează între hidrogenul din gruparea amino (NH2) de la C2 al citozinei si O din gruparea ceto (C=O), din pozitia a 6-a a guaninei, între N din pozitia 1 a citozinei și hidrogenul din gruparea NH din pozitia 1 a guaninei și între oxigenul din gruparea C=O a pozitiei 2 din citozină si hidrogenul din gruparea NH_2, de la C_2 al guaninei. Se remarcă echivalențele poziționale 6-6 și 1-1, în cazul perechii A-T și 6-6, 1-1 și 2-2, în cazul perechii G-C. Proprietatea împerecherii bazelor azotate purinice cu bazele azotate pirimidinice este dependentă de structura chimică intrinsecă a acestora, bazele azotate purinice și pirimidinice fiind structuri plane, cu suprafețe hidrofobe și apolare, dar cu margini

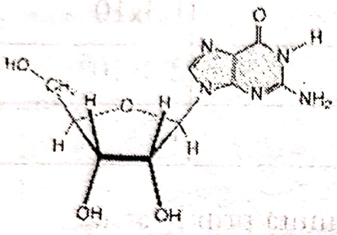
NUCLEOZIDE (în ARN) **NUCLEOTIDE (în ARN)**


NH₂
N
N
N
N
H
HO
CH₂
H
O
H
H
H
OH
OH

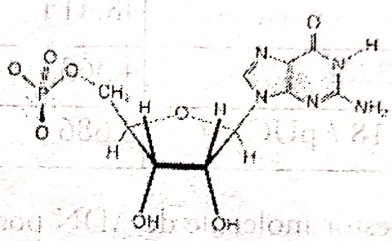
Adenozina


NH₂
O
O
P
O
O
CH₂
N
N
N
N
H
H
O
H
H
H
OH
OH

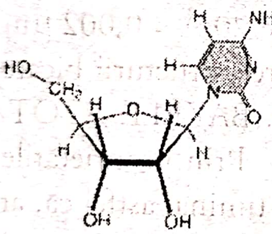
Adenozin 5' monofosfat (AMP)


O
N
N
H
N
N
NH₂
HO
CH₂
H
O
H
H
H
OH
OH

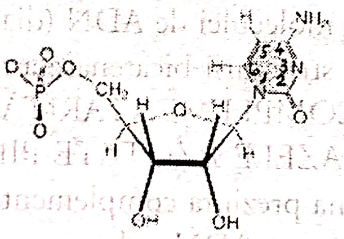
Guanozina


O
N
N
H
N
N
NH₂
O
O
P
O
O
CH₂
H
O
H
H
H
OH
OH

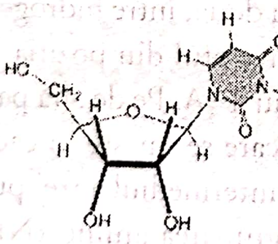
Guanozin 5'monofosfat (GMP)


H
NH₂
H
N
N
O
HO
CH₂
H
O
H
H
H
OH
OH

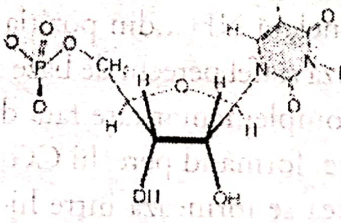
Citidina


H
NH₂
5
4
6
3
N
1
2
N
O
O
O
P
O
O
CH₂
H
O
H
H
H
OH
OH

Citidin 5'monofosfat (CMP)


H
O
H
N
N
H
O
HO
CH₂
H
O
H
H
H
OH
OH

Uridina


H
O
H
N
N
H
O
O
O
P
O
O
CH₂
H
O
H
H
H
OH
OH

Uridin 5'monofosfat (UMP)

polare, deoarece posedă grupări amino-ceto și atomi de azot, marginile lor prezentând astfel complementaritate specifică. Această complementaritate nu este exprimată oricând și oriunde, ci numai în condițiile în care bazele azotate intră în structura secundară, bicatenară a ADN. Nucleosidele pentru ADN sunt deoxiadenozina, deoxicitidina, deoxiguanozina și deoxitimidina, iar nucleotidele din ADN sunt deoxiadenozinmonofosfatul (d AMP), deoxicitidinmonofosfatul (dCMP), deoxiguanozinmonofosfatul (dGMP) și deoxitimidinmonofosfatul (dTMP).

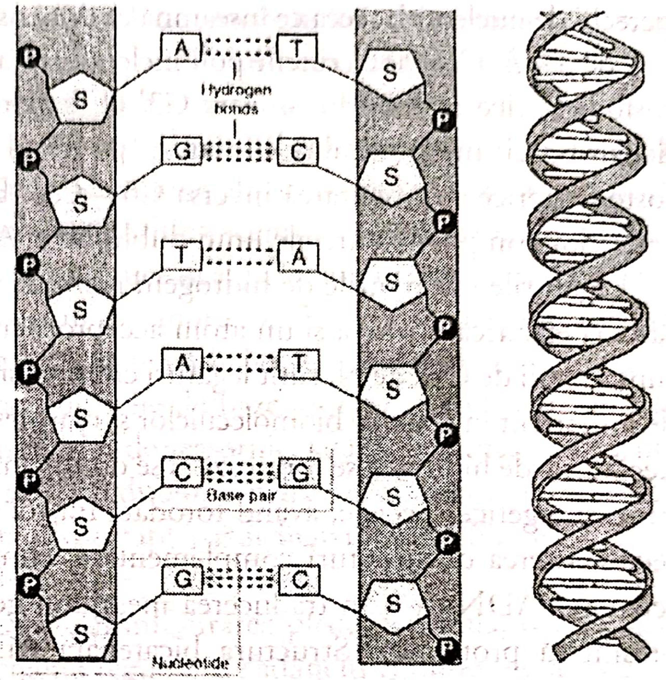


Fig. 3 — Un sector din dublul helix ADN, din care reiese poziția perechilor de baze azotate și coloanele glucido fosforice

Complementaritatea bazelor azotate purinice și pirimidinice este cea mai importantă proprietate a acizilor nucleici și ea conditionează toate proprietățile structurale si funcționale ale ADN, în primul rând capacitatea de autoreplicare și de transfer de informatie genetică. Cu alte cuvinte, toate proprietățile lumii vii sunt în ultimă instanță consecința complementarității bazelor azotate ce intră în structura ADN. Complementaritatea purină-pirimidină face ca: dacă pe una dintre cele două catene ale dublului-helix ADN se află secvențe de baze azotate A-T-C-G-T-A-G etc, pe catena compementară să fie posibilă o singură secvență: T-A-G-C-A-T-C. Complementaritatea purina-pirimidină impune restricții secvențiale, astfel încât, secventa de baze azotate de pe o catena, a dublului-helix ADN este fatalmente determinatoare a secvenței celeilalte catene reprezentând imaginea în oglindă a acesteia. Secvența de nucleotide a catenelor complementare ale unui dublu-helix se determină strict reciproc, doar în cadrul structurii bicatenare.

Complementaritatea strictă purină-pirimidină sau pirimidină-purină conferă structurii helicoidale bicatenare a ADN o formă filiformă regulată, cu un diametru constant de-a lungul întregului sau traiect (fig.3). O împerechere purina-purina sau pirimidină-pirimidină ar face ca dublul helix ADN să prezinte de-a lungul său neuniformităti, regiuni cu diametrul mai mare (purină-purină) ar alterna cu regiuni cu diametru mai mic (pirimidină-pirimidină) și astfel ar apare distorsiuni neregulate, care ar împiedica funcționarea normală, ceea ce nu se întâmplă în conditii naturale, normale.

Structura bicatenară prezintă repetiții ale înfășurării sale (pasul helixului) după fiecare 10 perechi de baze azotate, adică după 34Å. Planurile bazelor azotate sunt perpendiculare pe axa fibrei. Diametrul dublului helix ADN este de 20 Å, având o spiră (un pas) de 34 Å, astfel că fiecare spiră a dublului helix cuprinde câte 10 perechi de nucleotide, ceea ce înseamnă că dimensiunea unei perechi de nucleotide este de 3,4 Å. Cele două catene polinucleotidice sunt antiparalele, la una legăturile fosfodiesterice realizându-se între C3' al deoxiribozei unui nucleotid și C5' al deoxiribozei nucleotidului următor, pe când pe cealaltă catenă, legăturile fosfodiesterice au orientarea inversă C5' –C3'. De aici decurge antiparalelismul catenelor complementare ale unui dublu helix ADN.

Legăturile sau punțile de hidrogen, realizate între un atom de hidrogen cu o sarcina electrică pozitivă și un atom acceptor, cu sarcină electrică negativă, cum sunt atomii de O și de N, sunt legături chimice slabe, dar ele joacă un rol deosebit de important în reacțiile biomoleculelor și mai ales în funcționarea acizilor nucleici. Legăturile de hidrogen se formează și se dezorganizează cu ușurință, fără a necesita surse energetice speciale, având totodată un rol esențial în reacțiile care implică recunoasterea de structuri complementare, cum ar fi replicarea, transcrierea și repararea ADN ca și în traducerea mesajului genetic, din cadrul procesului de biosinteză proteinică. Structura bicatenară ADN prezintă de regulă o mare stabilitate fizică, asigurată pe verticală de punțile fosfodiesterice intracatenare, iar pe orizontală de punțile de hidrogen intercatenare și de stivuirea (**stacking**) perechilor de baze azotate, în cadrul dublului-helix, toate acestea făcând ca ADN dublu-catenar să apară ca o structură oarecum rigidă, paracristalină. Modelul de structură bicatenară a ADN a fost adesea comparat cu o scară în spirală în care

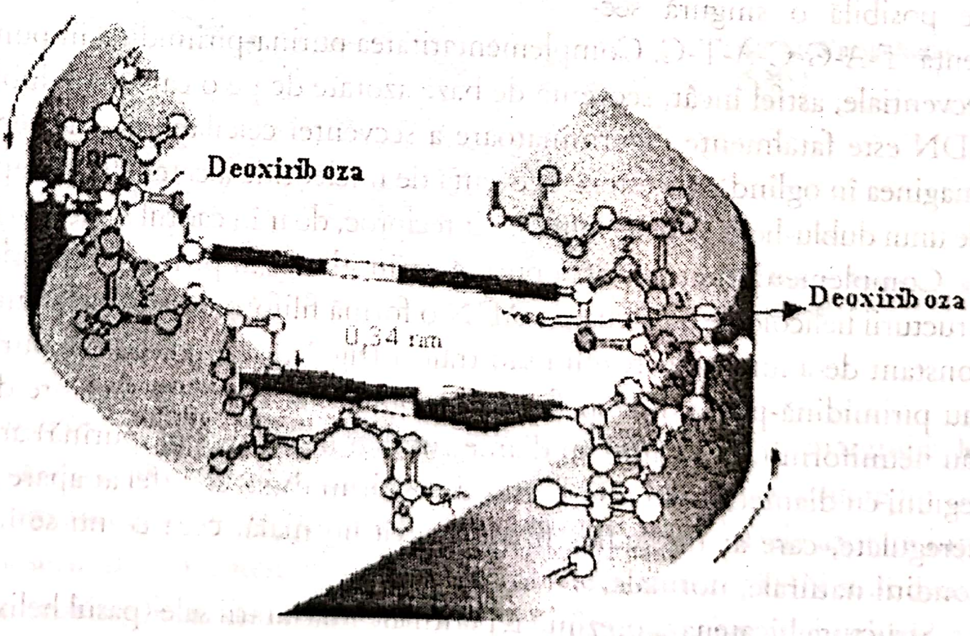


Fig. 4 — Antiparalelismul catenelor complementare ale dublului helix ADN.

balustradele sunt reprezentate de coloanele glucido-fosforice ale celor două catene complementare, iar treptele de perechile de baze azotate unite prin punti de hidrogen.

Caracteristicile structurale finale ale dublului-helix ADN sunt dictate de moleculele de deoxiriboză care se asează cu oxigenul inelului orientat în sus în cadrul unei catene și orientat în jos în cadrul catenei complementare (fig. 3 și 4).

Din cauza acestui aranjament opus al moleculelor de deoxiriboză în cele două catene și deoarece zahărul se leagă la o poziție excentrică a bazei azotate, întreaga moleculă de ADN este obligată să se răsucească, să se spiralizeze, rezultând nu o structură bicatenară dreaptă (așa cum din motive didactice, de simplificare, este uneori reprezentată) ci una spiralată, răsucită helicoidal (de unde denumirea de dublu-helix ADN), în care fiecare pereche de baze azotate, având o grosime de 3,4 Å se întoarce cu 36° în direcția acelor de ceasornic, față de perechea precedentă, astfel că rezultă un tur complet (360°) al dublului-helix ADN, la fiecare 10 perechi de nucleotide, acesta reprezentând de fapt pasul helixului ADN. Acest pas al dublului-helix ADN este de 34 Å.

În cadrul dublului-helix ADN, din înfășurarea plectonemicală, relațională a celor două catene rezultă o alternanță regulată de adâncituri minore și adâncituri majore, astfel că, la acelasi nivel al dublului-helix, o adâncitura minoră, de pe o parte, corespunde la o adâncitură majoră, de pe cealaltă parte. Acestea constituie „ferestre" mai mari sau mai mici, adică zone în care perechile de baze azotate sunt mai expuse exteriorului (adânciturile mari) sau mai puțin expuse (adâncituri mici), asemenea „ferestre" reprezentând de fapt zone de interacțiune cu diferite proteine, agenți de intercalare de tip bromură de etidiu sau de insertie a profagului etc.

Caracteristicile fizico-structurale finale ale duplexului ADN sunt dictate de moleculele de deoxiriboză care au orientat oxigenul inelului furanozic în sus, pe o catenă, si în jos, pe catena complementară, condiționând realizarea de legături fosfodiesterice orientate de la C5' la C3', pe o catenă, și de la C3' la C5', pe catena complementară, determinând antiparalelismul acestora.

Natura fenomenului ereditar implică faptul că o substantă, pentru a îndeplini rol de material genetic, ar trebui să prezinte variabilitate în structura sa, pe fondul unor caracteristici comune la toate speciile, al unor rigori structural-functionale stricte.

Analizele efectuate de CHARGAFF au demonstrat clar îndeplinirea de către ADN de diferite proveniențe a unor asemenea cerințe.

Cele patru baze azotate sunt prezente în structura ADN în cantități variabile, numai raporturile dintre bazele azotate purinice și pirimidinice (A/T și G/C) sunt echimolare și egale cu unitatea. Aceasta era prima infirmare a ipotezei tetranucleotidului lui Levene. Compoziția în baze azotate a ADN este deci specifică fiecărei specii. Deși în ADN al fiecărei specii se află toate cele patru tipuri de baze azotate în raporturi echimolare, cantitățile acestora sunt diferite, la diferite specii. De aici, s-a dedus că SECVENȚA DE BAZE AZOTATE DIN ADN REPREZINTĂ FORMA ÎN CARE INFORMAȚIA GENETICĂ ESTE ÎNSCRISĂ ÎN MACROMOLECULA ADN, această secvență specificând într-un mod anume, adică CODIFICÂND pentru o anumită secventă de aminoacizi, într-o proteină dată.

Prin anii '50 ai secolului XX era deja unanim admisă ideea relației de determinare a secvenței de aminoacizi din proteină de către secvența de baze azotate din ADN.

Cristalografia — difractia de raze X-a arătat ca o moleculă particulară de 12 perechi de nucleotide se poate prezenta ca un tur de helix, realizat printr-o răsucire ușoară a fiecărei perechi de nucleotide (cu 360°) ceea ce face să se îmbunătățească stocarea de nucleotide în cadrul dublului helix. Astăzi este acceptata ideea că există nu o singură structură a dublului helix ADN, ci o familie de structuri, fiecare de un tip caracteristic, în care variabilele sunt doi parametri: **n** = numărul de nucleotide per tur de helix și **h** = distanța dintre unitățile repetitive adiacente, adică perechile de nucleotide, respectiv de nucleotide. Variația rezultă din modificarea unghiului de rotație a perechilor de nucleotide adiacente în jurul legăturilor cu grade de libertate rotatională. Chiar și în cadrul aceleiași familii de structuri, parametri pot varia ușor. Astfel, pentru modelul B de ADN, n poate varia între 10 și 10,6.

Intre cele trei forme moleculare de ADN cunoscute pot apare tranziții, atunci când se realizează modificări corespunzătoare în condițiile de realizare a soluțiilor ADN.

Forma B este reprezentată de modelul clasic, propus de către Watson si Crick, și este întalnită în cadrul fibrelor de ADN cu umiditate relativă foarte mare (92%) și în soluții cu putere ionică redusă. Această formă este considerată prevalentă, ca stare nativă a ADN, în sistemele biologice vii.

Forma A este întâlnită în fibrele care prezintă umiditate relativă de 75%, necesitând prezența sodiului, potasiului sau cesiului ca elemente contracarante ale încarcăturii negative a ADN. In loc să stea întinse, perechile de baze sunt strâns înghesuite, spre axa helixului, din care cauză intră mai multe perechi de baze într-un tur de dublu-helix. Forma A este importantă din punct de vedere biologic, fiind aceea pe care o adoptă hibrizii ADN-ARN sau regiunile dublu-catenare ARN-ARN, prezența grupului hidroxil la nivelul C_2, în acest din urma caz, împiedicând ca ARN dublu-catenar sa adopte forma B de dublu-helix.

Forma C este adoptată atunci când fibrele de ADN sunt menținute într-o umiditate relativă de 66%, în prezența ionilor de litiu, având mai puține perechi de nucleotide per tur de helix decât ADN forma A. Aceste trei forme moleculare sunt adoptate de către toate moleculele de ADN, indiferent de secvența de baze azotate a acestora.

În cazul în care în secvența de nucleotide se află baze azotate cu particularități structurale distinctive apar și alte forme moleculare, precum formele D si E, care pot reprezenta variantele extreme ale uneia și aceleași forme moleculare, prezentând cele mai puține perechi de baze (8 sau 7 1/2) per tur de dublu-helix. Asemenea forme moleculare sunt adoptate de molecule particulare de ADN, lipsite de guanină. Toate aceste forme moleculare de ADN reprezintă așa numitul **ADN de dreapta**, cu înfășurare dextrală a dublului-helix.

Există însă și o altă formă moleculară de ADN numit ADN-Z, care a fost descoperit de către A.Rich și R.Dickerson (1979) de la MIT (Masachussetts Institute of Technology) și care prezintă contrastul cel mai puternic față de ADN model B. El reprezintă un dublu helix cu înfășurare senestră, numindu-se și **ADN de stânga**. Acesta prezintă numărul cel mai mare de perechi de baze per tur și în consecință prezintă structura cea mai putin înfășurată, înrulată. Este deci un dublu-helix lax și denumirea de ADN-Z derivă tocmai de la traiectul în zig-zag al coloanei glucido-fosforice pe care îl are de-a lungul dublului-helix, foarte diferit de cel ușor curbat pe care îl adoptă forma clasică de ADN-B.

Forma Z a dublului-helix a fost întâlnită în polimeri sintetici care au o secvență alternativă purină-pirimidină în care perechea G-C este repetată de n ori, rezultând un poli d ($^{GC}/_{CG}$). Tot ADN-Z se întâlnește și în polinucleotidul poli d($^{AC}/_{TG}$), simbolul „d“ derivând de la „deoxiriboză“. Cele două catene complementare rezultate în asemenea polideoxiribonucleotide au secvența repetitivă GC pe o catenă și secvența GC pe catena complementară, pe când celălalt tip de ADN-Z prezintă secvența AC pe o catenă, și TG, pe catenă complementară.

Forma Z a ADN există numai la concentrație salină foarte înaltă a cărei necesitate este impusă de contracararea repulsiei electrostatice crescute dintre nucleotide compresate în dublul-helix ADN-Z.

Semnificația biologică posibilă a ADN-Z este sugerată la observarea faptului că înlocuirea restului C în polimerul poli d($^{GC}/_{CG}$)n cu 5'-metilcitozina (5Me-C) determină o mult mai mare stabilitate a ADN-Z, la concentrații saline mai scăzute. Singura diferență dintre 5 Me-C și C este prezența grupului metil în poziția 5 și această modificare chimică a citozinei este o reacție care apare la nivelul unor secvențe dinucleotidice $^{GC}/_{CG}$ cu localizări specifice, in vivo. Aceasta face să pară plauzibil că ADN-Z, ar putea exista și in vivo, în circumstanțe adecvate, care permit ca un anumit sector al dublului-helix obișnuit, prezentând o anumită secvență de nucleotide, să adopte o configurație de ADN-Z. Una dintre condițiile necesare pentru formarea de ADN-Z in vivo este probabil prezența unor proteine particulare care stabilizează o asemenea structură. S-au elaborat modele pentru versiuni de ADN senestral (ADN-Z) ale formelor A, B și C ale duplexului ADN.

În toate structurile dublu-catenare, helicoidale, caracteristica biologică cea mai importantă, critică, este aceea că împerecherea de baze complementare este responsabilă de specificitatea asocierii catenelor.

Modelele de ADN descrise anterior iau în considerație același tip de organizare a unui dublu-helix, pe toată lungimea sa, dar acesta nu poate fi cazul general, in vivo. Cea mai mare parte a ADN celular este probabil organizat sub forma de ADN-B, cu posibile variațiuni regionale. Numai pe întinderi scurte sunt probabil realizate tranziții spre alte forme moleculare de ADN.

O întindere de 26-32 $^{GC}/_{CG}$ se poate converti în ADN-Z, pe când, de o parte și de alta a sa rămâne forma obișnuită, „clasică", de ADN B. Aceasta substanțiază afirmația potrivit căreia, in vivo, pot apare tranziții de la o conformație la alta de ADN, în anumite regiuni ale ADN celular.

Anticorpii pot face distincție între ADN-Z si ADN-B. Asemenea anticorpi se leagă la anumiți cromozomi de *Drosophila melanogaster*. Posibil ADN-Z este decelat la nivelul interbenzilor din cromozomii politeni, de la drosofila. Aceasta demonstrează că existența ADN-Z este un fenomen natural, dar nu se știe cât de lungi sunt sectoarele cu ADN-Z din cromozomii unei specii, cum este cazul acestui dipter.

Prin variația unghiului de rotație dintre perechile de nucleotide adiacente, de-a lungul dublului-helix ADN, de la 36° la 34,6°, se mărește numărul de perechi de nucleotide dintr-un tur complet al dublului-helix, spre a realiza 360°, rezultând valoarea medie de 10,4 perechi de baze cuprinse într-un tur complet de dublu-helix. Sunt generate astfel structuri dublu-helicale mai strânse sau mai laxe, în anumite regiuni ale dublului helix ADN și, în consecință, diferite forme (modele) moleculare ale ADN, pe una și aceeași macromoleculă ADN.

Dacă în ADN nativ, normal, de dreapta, perechile de nucleotide sunt „ascunse" la interiorul dublului-helix, în ADN de-stânga, acestea sunt expuse mai spre exteriorul dublului-helix și pasul elicei cuprinde nu 10, ci 6 perechi de nucleotide din care cauză, forțele de stivuire sunt mai mici, iar molecula de ADN-Z apare mai fragilă, având și un diametru mai mic. Plasarea perechilor de baze azotate mai spre exteriorul macromoleculei de ADN-Z face ca substanțele reactante, inclusiv cele mutagene si carcinogene, să interacționeze mai ușor cu bazele azotate. Este posibil ca structuri de tip ADN-Z să apară în anumite condiții chiar și în cadrul structurii ADN nativ, cu spiralizare de dreapta, doar pe anumite segmente ale sale. În cadrul desfășurării anumitor procese fiziologice, normale cum ar fi replicarea si transcrierea, regiunile dextre și cele senestre pot fi separate doar de două nucleotide. Este posibil ca spiralizarea de stânga a ADN, în care perechile de baze azotate sunt mai expuse interacțiunilor cu substanțe mutagene sau carcinogene, să stea la baza genezei unor stări patologice.

În afară de asemenea modele ale dublului helix ADN au mai fost descrise și altele. Astfel, în anul 1953, **Pauling** și **Corey** propun un model al structurii ADN alcătuit din 3 lanțuri răsucite în jurul aceleiași axe, cu grupările fosfat în apropierea axei și bazele azotate spre exterior. Tot în același an, **Fraser** propune o altă structură tricatenară, cu grupările fosfat spre exterior și bazele azotate la interior, legate prin legături de hidrogen. După cum s-a văzut, asemenea modele s-au dovedit a fi eronate.

În anul 1987, Peter Dervan a realizat sinteza in vitro a unui triplu-helix în care două catene sunt de tip Watson-Crick, pe când cea de a treia catenă este un oligodeoxiribonucleotid complementar la una dintre catenele dublului-helix. Utilizat în sisteme acelulare de transcriere, in vitro, un asemenea triplu-helix este inactiv. Atașarea celei de a treia catene a inhibat deci exprimarea genei din duplexul original, prin blocarea situsurilor de legare a proteinelor de control și a enzimelor necesare transcrierii. Se întrevede astfel posibilitatea ca, utilizând asemenea oligonucleotide, să poată fi blocată funcționarea unor gene nedorite, bunăoară a genelor virale, a oncogenelor sau a altor gene ce condiționează tare ereditare. Acesta este domeniul genelor antisens și al ARN anti-mesager în care s-au obținut deja rezultate concrete de inactivare a unor gene la bacterii și la plante precum gena **Petunia** ce controlează sinteza antocianului din petale.

Între 1987 si 1992 se înregistrează o veritabilă explozie de date referitoare la structuri neobișnuite ale ADN detectate in vitro, uneori identificate și in vivo.

Cercetările „in vitro“, utilizând plasmide recombinante, oligonucleotide sintetice și fragmente de restricție, au relevat conformații neobișnuite pe care le pot adopta secvențele de acizi nucleici. Ulterior, asemenea structuri neobișnuite au fost identificate și in vivo.

În tabelul de mai jos sunt redate deosebirile între ADN-A, ADN-B și ADN-Z:

	ADN-A	**ADN-B**	**ADN-Z**
Răsucirea	Dextrogiră	Dextrogiră	Levogiră
Unghi de pivotare (în grade)	33,1 + 5,9	35,9 + 4,3	GC — 51,3 + 1,0 CG — 8.5 +1. 1
Distanța între perechile de baze (în Angstromi)	2,9 + 0,39	3,36 + 0,42	GC — 51,3 + 1,6 CG — 8,5 + I I
Număr de perechi de baze per tur de elice	10,9	10,0	6,0
Unghi de înclinare (în grade)	13,0 + 1,9	- 2,0 + 4,6	- 8,8 + 0,7

Testele „in vitro", efectuate la *E.coli* au demonstrat existența ADN-Z la această bacterie, pe anumite sectoare ale cromozomului său. Utilizarea endonucleazelor de restricție a permis evidențierea la *E.coli*, ca și în ADN din kinetoplaste a unor conformații neobișnuite ale dublului-helix ADN redate în fig.5.

În structurile circulare de ADN bicatenar, precum plasmidele, se realizează tururi superhelicale, ADN căpătând configurație tridimensională, prezentându-se sub formă de structuri terțiare.

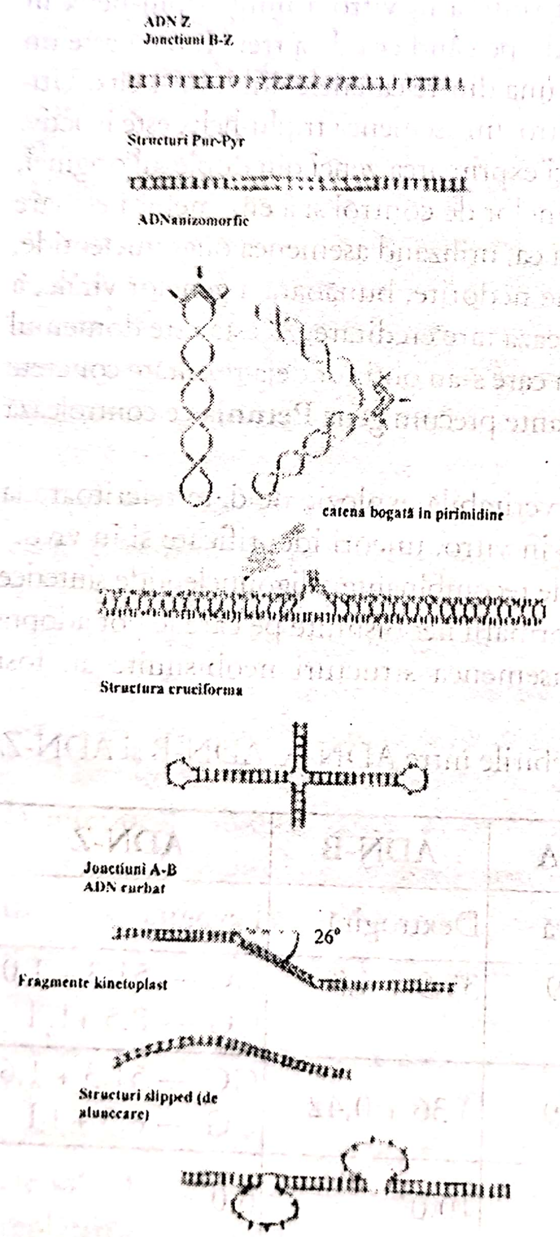

ADN Z
Jonctiuni B-Z
Structuri Pur-Pyr
ADNanizomorfic
catena bogată in pirimidine
Structura cruciforma
Jonctiuni A-B
ADN curbat
26°
Fragmente kinetoplast
Structuri slipped (de alunecare)

Fig. 5 — Structuri neobișnuite ale ADN.

Structura terțiară este caracteristică doar moleculelor circulare de ADN, sterice sau topologice, deoarece cele liniare au capete libere, pe care le desfășoară fără constrângeri.

La moleculele circulare apar forțe de contorsionare care impun dublului-helix circular să adopte configurații tridimensionale caracteristice, cunoscute sub numele de suprahelixuri sau torsade. Acesta este cazul ADN al unor virusuri, ADN mitocondrial, ADN kinetoplastic, ADN cloroplastic și ADN al plasmidelor bacteriene.

La ADN al virusurilor Polioma, Vaccina și SV 40 ca și în mitocondriile eucariotelor, apar 7-8 asemenea torsade pe micron de lungime de ADN. Prin imbricarea a 2-6 molecule circulare, unite în maniera cercurilor olimpice, rezultă structuri CONCATENARE sau CONCATENANI.

Moleculele circulare pot fi circular covalent închise (CCC) sau circular deschise (CCO), prezentând în acest din urmă caz o catenă cu o crestătură (hidroliza unei legături fosfodiesterice), pe când cealaltă catenă rămâne covalent închisă.

Torsadele sunt pozitive sau negative (în afara sau în interiorul cercului) și sunt înlăturate cu ajutorul unor enzime de relaxare a superhelixurilor (superspiralizărilor) din ADN (**nicking-closing enzymes**) adică enzime de crestare și închidere, cunoscute actualmente sub termenul generic de TOPOIZOMERAZE.

Topologia ADN a devenit un domeniu de mare interes, odată cu descoperirea enzimelor de tip topoizomerază. Aceste enzime modifică configurația topologică a ADN. Se spune metaforic că aceste enzime „fac și desfac nodurile din ADN“, având un rol esențial în desfășurarea evenimentelor genetice ale replicării, transcrierii, recombinării și reparării ADN.

Etimologic, semantic, denumirea înseamnă a acționa asupra conformației ADN modificând-o, fără însă a modifica lungimea dublului-helix ADN (**izomeros**). Atât la PK cât și la EK, s-au descris două tipuri de topoizomeraze, desemnate I și II. La majoritatea speciilor de bacterii, ADN circular este suprarăsucit negativ.

Topoizomeraza I relaxează structura suprarăsucită („*supercoiled*“) a ADN, prin introducerea unei crestături (desface legătura fosfodiesterică) în coloana glucido-fosforică a uneia dintre cele două catene a dublului helix, torsionate, permițând astfel ca un sector superrăsucit de ADN să se poată relaxa, prin desfășurarea liberă a catenei crestate și aceasta să treacă prin breșa creată. În urma unei asemenea crestări monocatenare, relaxări și manevre ale catenelor complementare care conduc la relaxarea duplexului ADN, pe când cealaltă catenă rămâne intactă, enzima reface legătura fosfodiesterică, restabilindu-se astfel integritatea structurală a duplexului ADN. ADN relaxat poate funcționa normal în procesele de replicare, transcriere, recombinare și, după ce și-a îndeplinit rolul în aceste procese, el trebuie să revină la starea sa normală, suprarrăsucită negativ (în sensul opus răsucirii normale a dublului-helix, spre dreapta), stare ca îi conferă stabilitate și rezistență față de factori dezorganizatori mecanici, fizici sau chimici.

Pentru realizarea acestei configurații superrăsucite intervine al doilea tip de topoizomerază – topoizomeraza II. Aceasta introduce tururi superhelicate în dublul-helix ADN relaxat, conferindu-i acestuia stare superspiralizată. Sub acțiunea acestor enzime are loc și conversia structurilor circulare în structuri CONCATENANE, precum și decatenarea lor. Când genomurile multiple, rezultate din replicări succesive ale ADN fagic sunt așezate cap la cap, în nemijlocită continuitate, rezultă structuri CONCATEMERE, din care sunt tăiate, sub acțiunea unor endonucleaze specifice, sectoare dublu-catenare genomice ce constituie miezul de acid nucleic al virionilor. Starea superspiralizată a acestora este indusă tot sub acțiunea unor topoizomeraze II celulare.

Când structurile circulare prezintă prelungiri liniare, ca niște cozi de rachetă de tenis, rezultă structuri LARIATE, întâlnite ca intermediari, în procesul recombinării.

Dacă cineva merge la fereastră și rotește șnurul dublu folosit să coboare transperantele în direcția acelor de ceasornic se obține un dublu-helix circular. Dacă între cele două fire ale șnurului se introduce un creion, se obține un model mecanic al procesului de transcriere genică,în care creionul este enzima ARN polimerază, pe când șnurul dublu, răsucit, este analogul dublului-helix ADN. Din acest model se poate constata că pe măsură ce ARN polimeraza se deplasează pe dublul helix ADN are loc suprarăsucirea ADN în față și relaxarea acestuia în spatele ARN-polimerazei. Cu alte cuvinte, ADN devine superrăsucit pozitiv în fața ARN polimerazei și superrăsucit negativ în spatele acestei enzime, atunci când ea este asociată cu matrița ADN, în procesul de sinteză a ARN celular.

Consecința inevitabilă a structurii dublu helicoidale a ADN, este superrăsucirea dublului-helix pe măsura translocării ARN polimerazei pe duplexul ADN. Sunt astfel generate modificări ale conformatiei dublului-helix ADN.

J.C.Wang și colaboratorii (1988) au arătat că asemenea procese de suprarăsucire apar atât la PK, cât și la EK, schimbându-se imaginea semnificației suprarăsucirii și importanței topologiei ADN, neluate prea mult în seama anterior acestor cercetări. Continuând experimentul cu șnurul și creionul, vom constata că la un moment dat creionul nu mai poate fi deplasat, deoarece dublul-helix nu mai poate nicidecum să fie desfăcut. Este necesară fie rotația reciprocă a ADN și a ARN polimerazei, unul în jurul celeilalte, fie intervenția unor mecanisme celulare care să înlăture superrăsucirile, atât pe cele pozitive, cât și pe cele negative. Printre aceste mecanisme, cel al intervenției TOPOIZOMERAZELOR pare a fi cel mai probabil și posibil.

Experiențele de inhibiție a ADN girazei au demonstrat imposibilitatea înlăturării superrăsucirilor pozitive din ADN plasmidial de *Escherichia coli* (Liu și Wang, 1987). ADN giraza apare a elimina superrăsucirile pozitive, mai curând decât a crea superrăsuciri negative în cromozomul și plasmidele de *E. coli*. Termenul de superrăsucire negativă este o noțiune nerelevantă, deoarece superrasucirea locală reală poate fi înalt pozitivă, înalt negativă sau neglijabilă, depinzând de poziția promotorilor, de poziția la un moment dat (curentă) a ARN polimerazei și de relația dintre rata de translocatie a ARN polimerazei și eficiența înlăturării superrăsucirii de către topoizomerazei II. Superrăsucirea depinde în masură mult mai mare de transcriere; decât depinde transcrierea de superrăsucire.

Cercetările lui Wang și colaboratorii (1988) subliniază semnificația structurilor lor neobișnuite din ADN (regiuni deschise, sectoare cruciforme, segmente cu ADN-Z, forme de H etc.) care apar „in vitro”, în condiții de superrăsucire negativă (fig.5). Aceste structuri se pot forma tranzient într-un domeniu negativ al valului de superrăsucire (în spatele unei ARN polimeraze aflate în mișcare) și să fie destrămate de proteine specifice. Printre altele, acestea ar putea explica activarea transcriptională în replicare și recombinare.

Analiza unei structuri cristaline a unui ADN sintetic — o secvență hexadecanucleotidică: C-G-C-G-C-G-T-T-T-T-C-G-C-G-C-G a permis lui Chattopadhyaya și colaboratorilor săi (1988) să evidențieze că aceasta adoptă o configurație în buclă de tip **hairpin** (agrafă de păr) monomerică, cu o tulpină hexameră de ADN-Z. S-a remarcat împerechere „neconvențională" de tip T-T și un helix de 13 baze. S-a evidențiat astfel capacitatea resturilor timină de a se autoasocia. Se cunosc, de asemenea, împerecheri purină-purină (G-A) și sunt posibile și împerecheri pirimidină-pirimidina (C-T), în primul caz diametrul helixului mărindu-se, în cel de-al doilea, acesta reducându-se corespunzător.

Astfel, apar cazuri de abateri de la împerecherile „clasice" de tip Watson-Crick, deoarece timina, în forma ceto, se împerechează cu timina în forma enolică și tot astfel timina se împerechează cu citozina, în acest din urmă caz ambele baze fiind în formă tautomerică comună. Această împerechere apare în structura hairpin cristalină.

Distanta C_1–C_1, în această structură cristalină, este de 8,6 Å, pe când în împerecherea normală „Watson-Crick", aceasta este de 10,5 Å. ADN-Z a fost decelat in vivo de către Jaworski și colaboratorii (1988), la bacteria *Escherichia coli.* Tot la această bacterie, Panayotos și colaboratorii (1986) au descris structuri cruciform. Structurile Pyr-Pyr s-au dovedit deosebit de interesante, pentru acestea propunându-se cel puțin trei modele, spre a explica structurile neobișnuite realizate de asemenea secvențe (Wells R.D. — 1980; Goodman și colaboratorii — 1980; Lyamichev și colaboratorii — 1986; Evans și Estratiadis -1986).

Pulleyblank, Haniford și Morgan (1985) descriu structuri tricatenare și tetracatenare în care un duplex ADN se realizează pe baza legăturilor „clasice" de tip Watson-Crick (A-T), pe când a treia (G.A=Tsau A=T.C) catena se atașează la bazele împerecheate în duplexul ADN, ca urmare a realizării unor **legături Hoogsteen**. Se presupune că structurile tetracatenare ar fi implicate în procesele de sinapsă cromozomală, realizând bivalenți în timpul diviziunii meiotice. Pe baza datelor de structura ADN se poate deduce funcția sa de moleculă informațională și se poate defini la nivel molecular GENA — unitatea functională de transmitere a caracterelor ereditare din genetica clasică. Gena reprezintă un segment (o porțiune din macromolecula de ADN) de lungime variabilă, care deține informația ereditară ce dirijează sinteza unei catene polipeptidice.

Acizii nucleici reprezintă polimeri cu suficiente componente (monomeri) care să permită o mare varietate de aranjamente. În acizii nucleici nu se înregistrează o repetiție monotonă a monomerilor, ca in cazul celulozei, unde se repetă un același monomer — glucoza, ci are loc o înșiruire statistică, aleatorie a celor patru nucleotide, ceea ce dă posibilitatea realizării unui număr nelimitat de aranjamente de secvente de nucleotide, fiecare aranjament reprezentând o altă informație ereditară. Aceasta stă la baza enormei diversități a viețuitoarelor, întâlnită în natură, de la apariția lor și până astăzi. Deși în structura acizilor nucleici intră doar patru tipuri diferite de nucleotide, posibilitățile de codificare biochimică sunt teoretic infinite. Astfel, numai un segment de ADN lung de 100 perechi de nucleotide, se poate prezenta ca 4^{100} variante diferite, reprezentând tot atâtea seturi de informație ereditară. În mod normal, secvența de nucleotide a macromoleculelor de acizi nucleici biologic active are ca limită inferioară circa 3000 perechi de nucleotide, ajungând la limite superioare de ordinul a sute de mii și milioane de perechi de nucleotide.

Pe asemenea considerente ne putem explica enorma diversitate de specii și organisme existente în natură, ceea ce reprezintă doar o parte din enormul potențial de codificare pe care îl posedă acizii nucleici.

4. EXCEPȚII DE LA STRUCTURA BICATENARĂ A ADN

Cercetările lui Sinsheimer (1959), efectuate la bacteriofagul **φ X 174,** al bacteriei *E.coli* au arătat că, la acest virus, ADN se prezintă în mod normal sub forma unei monocatene (fig. 6). Enzima fosfodiesterază extrasă din *E.coli* este ineficace pe structuri bicatenare de ADN, dar la ADN de φ x 174 s-a dovedit a fi eficace, determinând ruperea acestuia (desface punțile fosfodiesterice ale monocatenei). ADN monocatenar de φ x 174 are în mod obișnuit forma circulară, iar în urma acțiunii fosfodiesterazei molecula sa capătă formă liniară, fapt ce se poate dovedi prin ultracentrifugare în gradient de densitate de clorură de Cesiu (CsCl), această structura liniară apărând la un alt nivel decât structura nativă a ADN de φ X 174 . Analiza compoziției în baze azotate a ADN de φ x 174 a relevat, de asemenea, deosebiri radicale față de ADN de la toate organismele analizate: raportul A/T ca și raportui G/C este diferit de 1. S-a dovedit astfel ca ADN de φ x 174 se prezintă în mod normal ca o structură circulară și monocatenară. Asemenea structură monocatenară a ADN a fost evidențiată și la alți bacteriofagi, precum G (înrudit cu fagul (φ x 174) R și 513.

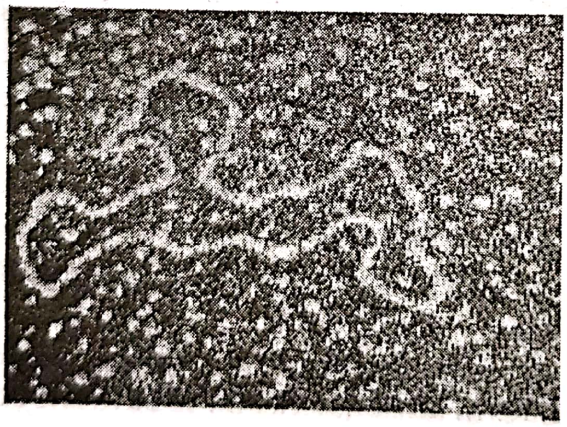


Fig. 6 — ADN monocatenar al bacteriofagului φ X 174, vizualizat la microscopul electronic.

Așa cum se va vedea, pentru realizarea sintezei replicative a ADN monocatenar, acesta trece de la forma monocatenară la o formă bicatenară tranzientă, numită **forma replicativă**, pentru ca apoi sa revină la structura monocatenară, atunci când moleculele fiice vor fi încapsidate, spre a forma miezul de acid nucleic al fagilor maturi.

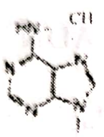
5. ALTE ASPECTE ALE STRUCTURII CHIMICE A ADN

Frecvența a două baze, cele mai apropiate în ADN la bacteriofagi, bacterii și drojdii reflectă abundența acestor baze în ADN. De exemplu, frecvența celor mai apropiate baze învecinate 5'-CG-3' și 5'-GC-3' în ADN la procariote este aproximativ aceeași și aproape randomică. Același lucru este valabil pentru dinucleotidul cu vecinătățile cele mai apropiate 5'-GA-3' și 5'-AG-3'. Totuși, la animale, virusuri animale și plante, în ADN, frecvența dinucleotidului 5'-CG-3' este de T până la 1/5 din aceea a lui 5'-GC-3', astfel că secvența 5'-CG-3' apare relativ rar în ADN de la eucariote superioare. Această particularitate este legată de faptul că dinucleotidul este utilizat ca semnal de metilare, cu rol esențial în reglarea expresiei genice la eucariote.

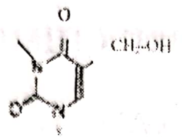
Iată după Singer și Berg (1991) frecvențele celor mai apropiați vecini în diferite molecule de ADN:

Sursa matriței ADN	5'-CG-3'/5'-GC-3'	5'-AG-3'/5'-GA-3'
Bacteriofagul λ	1,02	0,90
Bacteriofagul T2	0,82	0,96
Escherichia coli	0,95	1,0
Micrococcus lysodeikticus	1,13	0,75
Bacillus subtilis	0,82	0,87
Virusul SV 40	0,14	1,35
Virusul Polyoma	0,35	1,28
Virusul shope papilloma	0,44	1,16
Saccharomyces cerevisiae	0,87	0,96
Chlamydomonas	0,68	1,36
Gallus domesticus	0,21	1,28
Homo sapiens	0,23	1,15
Mus musculus	0,23	1,15
Bos taurus	0,36	1,10
Triticum aestivum	0,78	0,97

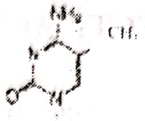
După ce ADN este sintetizat unele baze azotate fie purinice fie pirimidimice suferă modificare chimică. De exemplu, unele molecule de ADN conțin 5-metil-citozina, 5-hidroximetilcitozina, 5-hidroximetiluracil și N_6-metiladenina.



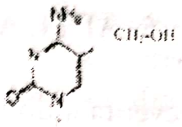
N^6-metiladenina



5-hidroximetiluracil



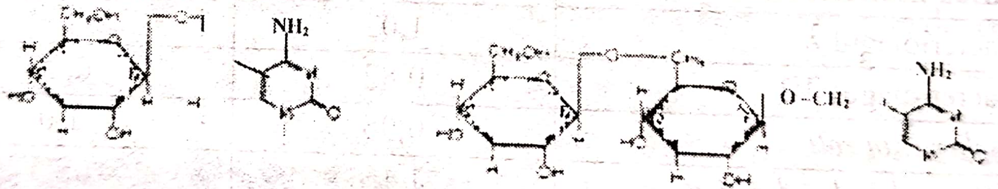
5-metilcitozina (MC)



5-hidroximetilcitozina (HMC)

În ADN al unor bacteriofagi se leagă un mono sau un dizaharid la grupul hidroximetil al hidroximetilcitozinei, printr-o punte glicozidică.

Eucariotele inferioare și nevertebratele conțin cantități relativ mici de 5-metilcitozina și N6-metiladenina. Metilarea bazelor azotate este mai extinsă la vertebrate, cea mai comună fiind 5-metilcitozina din dinucleotidul CG. La vertebrate, peste 50% din dinucleotide CG sunt metilate. S-a constatat că 5-metilcitozina este întâlnită și în trinucleotidele CNG, N putând fi reprezentat de C, A sau T. De asemenea, restul metilat al citozinei poate fi întâlnit și în combinații precum, glicosil HMC și gentobiosil HMC (fig. 7)



Glicosil HMC

Gentobiosil HMC

Fig. 7 — Combinații în care intră citozina metilată.

6. DENATURAREA ȘI RENATURAREA ADN

În condiții fiziologice normale, macromolecula ADN se prezintă ca o structure stabilă. Stabilitatea ei este conferită de legăturile fosfo-diesterice, intracatenare, legaturile de hidrogen intercatenare (două între A și T și trei între G și C, regiunile

ADN bogate în perechi G-C fiind mai stabile decât cele bogate în A-T) și forțele de stivuire (suprapunerea perechilor de nucleotide, în cadrul structurii bicatenare). Aceste forțe ce asigură stabilitatea macromoleculei ADN fac ca o moleculă ADN ce are mai mult de 10 perechi de nucleotide, să fie stabilă la temperatura camerei. Peste anumite limite de temperatură (între 63°C si 100°C), stabilitatea legăturilor de hidrogen cedează, având loc desfacerea dublului-helix în cele două catene polinucleotidice, complementare, fenomen numit DENATURARE TERMICĂ, ADN trecând de la conditia dublu-catenară, la condiția monocatenară, însoțită de reducerea drastică a vâscozității soluției ADN. Cea mai scazută temperatură de denaturare cunoscută este de 65°C și se înregistrează în cazul polinucleotidului sintetic poli-d (A-T).

Absorbanța

Denaturarea ADN poate fi cercetată studiind parametrul absorbanță, ceea ce reprezintă capacitatea unei soluții de ADN de a absorbi lumina UV cu lungimea de undă de 200 nm. Bazele acizilor nucleici absorb puternic lumina UV de 260 nm.

Absorbția (A) este dată de relația: $\log_{10}$ (intensitatea de transmitere a luminii de către o soluție cu grosimea de l cm/intensitatea luminii incidente).

O concentrație de ADN de 50 micrograme/mililitru are o valoare A la 260 nm egala cu 1.

A_{260} a ADN bicatenar = 1,00

A_{260} a ADN monocatenar = 1,37

A_{260} a bazelor libere = 1,60.

ADN bicatenar este hipocromic.Bazele azotate sunt hipercromice.

Încălzirea ușoară, treptată a unei solutii de ADN permite stabilirea unei curbe de topire (**melting curve**) (fig. 8).

Aspectul curbei de denaturare a ADN ne permite să tragem concluzii asupra conținutului în perechi de baze azotate, având în vedere că perechile A-T, cu două punți de hidrogen, denaturează mai ușor decât perechile G-C, între care sunt trei punti de hidrogen.

Valoarea Tm este raportă la procentul G+C. Tm crește o dată cu creșterea conținutului G+C și acest fapt a fost evidentiat la ADN al diferitelor specii de bacterii, al căror conținut G+C variază între 20% și 80%. Prin tehnici de dispersie optică rotatorie (ORD) și dicroism circular (CD), aplicate la monocatene ADN si ARN s-a arătat că o fracție mare de baze în polinucleotidele monocatenare sunt aranjate în helix. Chiar și la dinucleotide s-a decelat un aranjament paralel al celor două baze (**parallel array**), ceea ce denotă faptul că forțele de STOCARE a bazelor (**base — stacking**) sunt prezente chiar și la nivelul unor asemenea molecule mici de acizi nucleici. Agenții care slăbesc interacțiunile hidrofobice elimină forțele de stocare, pe când cei care rup punțile de hidrogen nu au efect asupra acestora, când

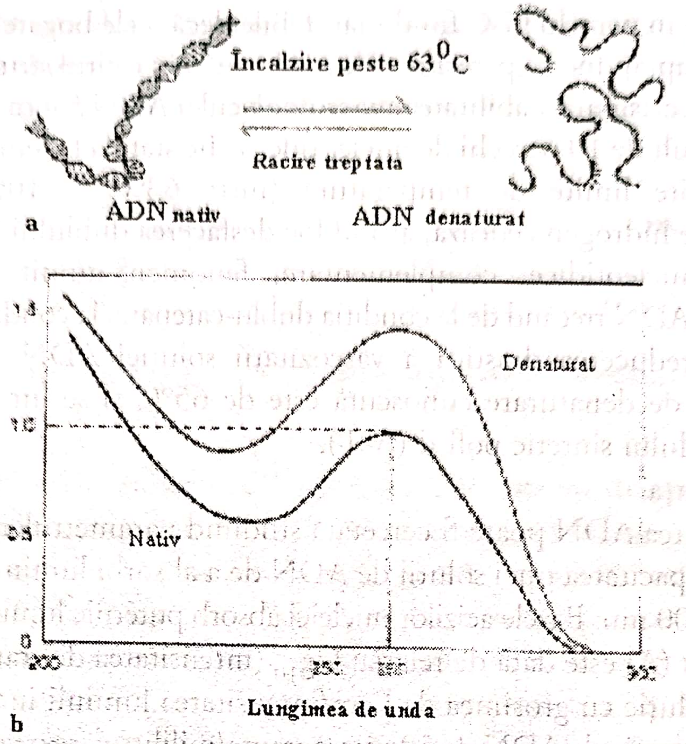


Fig. 8 — Denaturarea și renaturarea duplexului ADN (a) și mersul curbei de absorbție în UV (b), cu înregistrarea efectului hipercrom, la 260 nm.

polinucleotidele sunt monocatenare, dar le reduc la nivelul structurilor bicatenare, în aceeași măsură în care ele sunt reduse prin denaturarea ADN. De aici, se trage concluzia că bazele azotate în cadrul unei structuri bicatenare sunt supuse unor forțe de stocare mult mai puternice decât în structurile monocatenare. Bazele stocate sunt mai ușor de unit prin punți de hidrogen și, la rândul lor, bazele unite prin punți de hidrogen sunt mai usor de stocat în cadrul unei structuri bicatenare.

Forțele de stocare a bazelor azotate reprezintă o acțiune necooperantă. Acest lucru este important, deoarece într-o secvență ABCDEFGHI cel mai ușor de atacat de către un agent oarecare este baza din pozitia A a cărei stocare în secvență depinde doar de baza B; baza E este mai greu să fie scoasă din secventă, ea depinzând în stocarea ei atat de D cât și de F, ș.a.m.d.

Tm este mult mai mică la moleculele de ADN de lungime mai mică.

ADN este o structură dinamică, în care regiunile bicatenare se deschid frecvent spre a deveni ochiuri sau bucle monocatenare. Acesta este fenomenul de RESPIRAȚIE A ADN, care permite interacțiunea ADN cu diferite proteine spre a-i fi „citită“ informația codificată. „Respirația“ apare mai frecvent în regiunile bogate în perechi A=T, decât în perechi G-C, pentru motivul că perechile A-T, având doar două punți de hidrogen, sunt mai usor de denaturat fiziologic. Nu întâmplător la nivelul originii replicării se află o bogăție de perechi A-T.

Sunt multe proteine care provoacă denaturarea ADN. Ele se numesc PROTEINE DE DESTABILIZARE A HELIXULUI, de relaxare sau de topire a helixului ADN. Una dintre acestea este produsul genei 32 a fagului T4, de *E.coli* numit proteina 32. Ea se prinde puternic la bazele unui ADN monocatenar și moleculele sale se aliniază una lângă alta, de-a lungul catenei. Legarea primei molecule de proteină 32 la un duplex ADN este posibilă prin exploatarea mecanismului de separare a ADN dublu catenar. De îndată ce o singura moleculă de proteină 32 a apucat să se prindă de o monocatenă a ADN, lângă ea vor veni altele, destabilizând dublul-helix și denaturându-l.

Asemenea proteine joacă rol esențial în replicare, ele desfăsurând structura bicatenară și pastrând catenele complementare sub formă separată și astfel, acestea pot funcționa ca matriță pentru sinteza de noi catene complementare. Asemenea proteine mai facilitează asocierea de monocatene în cursul recombinării genetice. Ele se numesc **proteine ssb**, de legare la monocatenă (de la **single strand binding proteins**).

La temperaturi ridicate se poate rupe coloana glucido-fosforică. Se pot utiliza pentru denaturare și alcalii. La pH înalt, încarcătura multor grupe angajate în formarea legăturilor de hidrogen se schimbă și astfel bazele pierd capacitatea de a forma legături de hidrogen.

La pH mai mare de 11,3 toate legăturile de hidrogen sunt eliminate și ADN este complet denaturat. În tehnicile de bandare cromozomală se utilizează denaturarea cu alcalii, ADN fiind destul de rezistent la hidroliză alcalină.

Denaturarea este completă la temperaturi peste 90°C. Pentru a preveni reasocierea monocatenelor prin împerecheri de baze se păstrează ADN denaturat la concentratii saline înalte și la temperatura camerei. Se adaugă și formaldehidă, atunci când temperatura este înaltă, aceasta reactionând cu grupele NH_2 ale bazelor si previne formarea legăturilor de hidrogen. De asemenea, la pH înalt nu se pot realiza punti de hidrogen.

Renaturarea reprezintă refacerea structurii native, dublu catenare a ADN, pornind de la monocatene separate prin denaturare. Renaturarea se mai numeste REANNEALING, adică reasociere. Prin renaturare, în funcție de procentul său, se stabileste relația filogenetică dintre două specii. De asemenea, se poate stabili și dacă o anumită secventă apare repetat în ADN, adică se pun în evidență fracțiile de ADN repetitiv. Pentru renaturare sunt necesare două conditii:

Concentratia salină trebuie să fie suficient de mare, spre a înlătura repulsia electrostatică dintre fosfații color două catene polinucleotidice. Se utilizează de regulă 0,15 — 0,50 M NaCl.

Temperatura trebuie să fie suficient de înaltă, spre a elimina legăturile de hidrogen intracatenare apărute la întâmplare (randomizat). Temperatura optimă de renaturare este cu 20°–25° sub valoarea lui Tm.

Renaturarea este un proces mult mai lent decât denaturarea. Deoarece este rezultatul doar al mișcării randomice a monocatenelor în soluție, renaturarea este un proces dependent de concentratia acestora.

Experiențe de marcare cu izotopul greu ^{15}N al azotului comun ^{14}N au arătat că fiecare moleculă bicatenară de ADN renaturat nu se formează prin reasocierea monocatenelor din care a fost alcătuită înainte de denaturare, ci printr-o asociere randomică de monocatene, provenind de la diferite molecule bicatenare de ADN și tocmai acest fapt arată că ADN renaturat, deși cu structură nativă bicatenară, este totusi o structură hibridă.

Acest fapt este și mai clar, când în renaturare se utilizează monocatene derivate din dublu-helixuri ADN de proveniență diferită, adică apartinând la specii diferite, mai mult sau mai putin înrudite filogenetic. Se pot utiliza filtre de nitroceluloză care leagă monocatenele de ADN foarte puternic, dar nu poate lega nici ADN bicatenar, nici ARN. Cu ajutorul lor se poate măsura hibridizarea moleculară.

O soluție de ADN renaturat are și monocatene rămase neasociate. Prin filtrare prin asemenea filtre de nitroceluloză, ADN renaturat trece, pe când monocatenele sunt reținute de filtru, putând fi măsurată astfel fracția din ADN care a renaturat. Dacă monocatenele reținute pe filtru sunt puse în contact într-un vas în care se află o soluție ce contine o cantitate mică de ADN denaturat și marcat radioactiv, precum și un reactiv care previne legarea aditională de monocatene ADN la filtru, după o perioadă de timp în care are loc renaturarea, urmată de spălarea filtrului radioactivitatea va fi găsită pe filtru, numai dacă a avut loc renaturarea. Pe această cale, se poate stabili cât de înrudite sunt două specii, apreciind procentul de renaturare realizat.

Dacă se utilizează ADN denaturat de *E.coli* și ADN marcat cu ^{14}C de *Salmonella,* fracțiunea de ADN marcat ^{14}C retinută pe filtru este fracțiunea din ADN de *Salmonella* care este complementar cu ADN de la *E.coli.* Aceasta a hibridizat în condiții de reasociere. Prin aceasta se estimează relația evolutivă dintre cele două genuri de bacterii.

Pe aceeasi cale se realizează și hibridarea ADN-ARN, plasând filtrul ce a reținut monocatene ADN într-o soluție cu ARN marcat radioactiv. După renaturare, filtrul se spală și hibridizarea este detectată prin prezenta ARN radioactiv pe filtru.

Curbele Cot redau dependența renaturării de concentrația monocatenelor. Evenimentul inițial în renaturare este coliziunea. Rata de renaturare se supune astfel legii acțiunii maselor și crește cu cresterea concentrației ADN. Concentrația monocatenelor ADN este dată în g/mol.

Moleculele de ADN de fag T7 au o greutate moleculară $M=2,5x10^7$, pe când cele ale ADN de fag T4 au $M = 1,1x10^8$. Concentrația moleculară a ADN T7 este de 4,4 din aceea a ADN T4, dar valorile A260 ale celor două soluții de ADN sunt aceleași. Admitem că nu există omologie de secvență de bază (nu există secvențe comune) între cele două molecule de ADN. Cele două soluții se amestecă, se denaturează și renaturează, și se masoară A260 în funcție de timp. Se obtine o curbă ce are două caracteristici:

1. prezintă două trepte, fiecare corespunzând la jumătate de descreștere a A260, deoarece concentrația initială a ADN (în g/mol) a fiecărui fag a fost aceeași;

2. diferă timpul la care renaturarea fiecărui component este completă pe jumătate. Componenta mai înceată este ADN T4 a cărui concentrație moleculară este mai joasă. Cinetica renaturării în termeni de concentratii inițiale ale ADN-Co — (exprimate în moli de baze/litru) concentrația C a ADN nerenaturat la timpii t (în minute) și K2 o constantă dependentă de temperatura și de dimensiunea fragmentelor ADN va fi dată de relația:

$C/Co=1(1+K2Cot)$

Când $C/Co =1/2$, atunci $Cot1/2= 1/K2$

Analiza Cot a arătat că ADN eucariot are o fracțiune semnificativă ce constă din secvențe repetate, uneori de milioane de ori.

Combinată cu microscopia electronică, analiza renaturării a arătat că moleculele renaturate prezintă bucle monocatenare, sectoare împerecheate și cozi neîmperecheate. Asemenea molecule se numesc *heteroduplexuri*.

Temperatura de denaturare numită și **punct de topire** sau temperatură de topire (**melting temperature**) este diferită la diferite specii, fiind în funcție de bogăția în perechi G-C din ADN al speciei respective: cu cât acesta conține un număr mai mare de perechi G-C între care există trei punti de hidrogen, față de numărul perechilor A-T, între care exista doar două punți de hidrogen, cu atât temperatura cerută pentru ruperea legăturilor de hidrogen și separarea catenelor (temperatura de topire) este mai mare.

Iată la patru specii de bacterii care este acest punct de topire:

Streptoccocus pneumoniae	86°C
Escherichia coli	90°C
Serratia marcescens	94°C
Mycobacterium phlei	97°C

Aceste valori ale TM denotă indirect proporția de AT raportată la proporția GC.

Dacă amestecul de monocatene rezultate prin denaturarea dublului helix ADN se răcește brusc, monocatenele ramân permanent separate și un asemenea ADN se numeste ADN DENATURAT. Dacă, amestecul de monocatene se răcește treptat, lent, are loc o reasociere a catenelor, cu refacerea legăturilor de hidrogen dintre ele și cu restabilirea structurii bicatenare a ADN. Acest fenomen de restabilire a structurii bicatenare din monocatene complementare s-a numit RENATURAREA ADN.

Temperatura de topire cerută pentru denaturarea ADN poate constitui un indicator indirect asupra compoziției în baze azotate a ADN. Astfel, un ADN bogat în perechi A-T va prezenta o temperatură de denaturare mai mică față de un ADN în care predomină perechile G-C.

Când o soluție de ADN este supusă unor temperaturi mai mari de 100°C are loc ruperea legăturilor fosfodiesterice, cu destrămarea coloanei glucido-fosforice.

Denaturarea ADN este însoțită de EFECTUL HIPERCROMATIC, adică de creștere a intensitatii absorbtiei razelor UV de către soluția de ADN denaturat, ca urmare a „demascării", a expunerii bazelor azotate la exterior, în direct contact cu radiatia UV. Această „demascare" este realizată prin trecerea de la structura bicatenară normală (în cadrul căreia bazele azotate sunt „mascate" de coloanele glucido-fosforice, fiind deci „ascunse" înspre interiorului dublului-helix ADN) la structura monocatenară, în monocatene bazele azotate fiind expuse incidentei directe a razelor UV, oferind suprafețe mult mai mari pentru absorbția acestor raze ultraviolete, bazele azotate fiind cromofile și hidrofobe.

Renaturarea ADN este însotită de EFECTUL HIPOCROMATIC, adică de reducerea absorbției razelor UV, deoarece prin refacerea structurii dublu-catenare, bazele azotate „se ascund" din nou spre interiorul structurii bicatenare. Dacă denaturarea este initiată la nivelul unor sectoare din dublul-helix ADN bogate în perechi A-T, acestea fiind zonele de mai slabă stabilitate, renaturarea este inițiată la nivelul unor regiuni ale monocatenelor ADN ce cuprind bazele complementare G si C, cu realizarea de perechi G-C, mai stabile decât perechile A-T. Asemenea sectoare la nivelul cărora este inițiată renaturarea ADN se numesc *centre de nucleație* sau *nuclee de renaturare*, respectiv de reasociere.

Denaturarea și renaturarea acizilor nucleici sunt procese fizice foarte importante, folosite de către oamenii de știință, fie în studiul relatiilor filogenetice dintre specii, fie în tehnologia ADN recombinant. Speciile înrudite filogenetic au o secvență de baze azotate (o informatie genetică) cu un grad înalt de similitudine și, în consecință, ele prezintă temperaturi apropiate de denaturare a ADN, realizând și o renaturare mai rapidă a monocatenelor lor, atunci când sunt amestecate, față de speciile mai îndepărtate filogenetic. Comparația dintre diferitele specii se poate realiza pe baza VALORII COT. Co — reprezintă concentratia de ADN în g/l, iar t reprezintă timpul necesar pentru ca jumătate (50%) dintre monocatenele inițiale să se reasocieze (să reconstituie structuri bicatenare). Studiindu-se valorile Cot și curbele care redau cinetica procesului de reasociere (**reannealing**) se poate aprecia complexitatea secvențialității de baze azotate (existența de secvențe nerepetate sau unice și de secvențe simple, dar repetate de un număr de ori). Totodată, se pot stabili relațiile filogenetice dintre specii. Cu cât există un procent mai mare de secvențe repetitive în ADN, cu atât valoarea Cot este mai mică. Cu cât speciile studiate prin denaturarea-renaturarea ADN sunt mai înrudite filogenetic, cu atât ele vor prezenta valori Cot mai apropiate.

Procentul de renaturare între monocatene de ADN de la om și monocatene de ADN de la cimpanzeu este de aproximativ 90%, pe când cel dintre ADN uman și ADN de șoarece este de numai 25%.

In tehnologia ADN recombinant, hibridarea moleculară ajută la stabilirea exactă și rapidă a transferului unei gene eucariote în celula bacteriană prin folosirea a ceea ce s-a numit „SONDA moleculară“, care nu este altceva decât o monocatenă ADN sau ARN marcată radioactiv sau neradioactiv și care este complementară segmentului genei eucariote transferate. Dacă are loc reasocierea unei asemenea sonde moleculare cu un segment de ADN extras de la celula bacteriană în care a fost clonată gena eucariotă, înseamnă ca transferul acestei gene în celula bacteriană a fost eficient, real.

Totodată, prin hibridări moleculare ADN-ARN se poate realiza cartarea genelor răspunzatoare de sinteza ARN prin asa-numita *hibridare „in situ“*, adică fară extractie de ADN, denaturarea acesteia realizându-se la nivelul cromozomilor, în preparate citologice, pe lame microscopice. Aceste preparate sunt incubate cu molecule de ARN ribozomal, de un tip dat, marcate și aflate într-o soluție salină, corespunzatoare, astfel că monocatenele ARN se vor uni pe bază de complementaritate cu un segment dat al monocatenelor ADN pe care se află gena pentru acel tip de ARN ribozomal. După spălarea lamelor pe care se află preparatele citologice, spre a îndepărta restul de monocatene ARNr rămase neasociate, pe aceste lame se aplică emulsie fotografică, se incubează la întuneric spre a realiza impresionarea, se developează și se analizează la microscop, astfel că acolo unde a avut loc, la nivelul cromozomului, hibridarea ADN-ARN apar grain-uri de argint caracteristice, acela fiind locul unde se află gena pentru tipul de ARN ribozomal folosit în hibridare. Prin asemenea experiențe de hibridare se poate localiza poziția și a altor gene, folosind alte tipuri de ARN marcat cum ar fi ARN solubil si ARN mesager. De exemplu, folosind în hibridare ARN mesager, purtător al mesajului genetic pentru sinteza insulinei, ARNm ce poate fi ușor izolat din celulele pancreasului endocrin, se poate localiza pe cromozom poziția genei insulinei.

7. TAUTOMERIA BAZELOR AZOTATE ȘI SEMNIFICAȚIA SA MUTAȚIONALĂ

Stabilirea punților de hidrogen între perechile de baze azotate din cadrul moleculei bicatenare este dependentă de starea polarizată a bazelor purinice și pirimidinice numită și STARE DE TAUTOMERIE. Aceasta apare datorită legăturilor duble, conjugate, ceea ce face ca bazele azotate să prezinte izomerie de poziție. Tautomeria presupune stări de izomerie de poziție a unei duble legături și a atomilor de hidrogen învecinați. Aceste stări de izomerie de poziție se realizează prin deplasarea unui atom de hidrogen de la o grupare la alta a nucleului purinic sau pirimidinic. Grupările implicate în realizarea starilor de izomerie de la care pleacă sau vine atomul de hidrogen contin atomul de azot sau atomul de oxigen (Fig.9). Formele sau stările tautomere caracteristice bazelor azotate purinice și pirimidinice sunt de tip **lactam-lactim** sau ceto (C=O) — enolică (C-OH) și de tip amină (NH_2) — imină (NH).

Tautomeria ceto-enolică caracterizează guanina, timina și uracilul, acestea conținând gruparea ceto (C=O), în poziția a 6-a, pe când tautomeria amina-imina caracterizează adenina si citozina, deoarece aceste baze azotate au gruparea NH2 extrainelara, în pozitia C6 . Forma tautomerică mai stabilă energetic este forma ceto și aceasta se întâlnește în mod normal în acizii nucleici. În cazul acestei forme, oxigenul de la C6 al timinei, guaninei sau uracilului se leagă de carbon prin legătură dubla, pe când azotul din pozitia 1 (N1) se leagă la C6 printr-o legătură simplă. În urma migrării hidrogenului din N1 la oxigen, gruparea ceto devine enol. Totodată, dubla legătură migrează la legătura N-C între poziția 1 și poziția 6.

Tautomeria amino-imină se întâlnește la adenină și citozină. Starea amină este mai stabilă energetic și adenina și citozina prezintă gruparea amină (NH2) în poziția C6, fiind legate de acest carbon prin legătură simplă. Azotul N_1 este legat de C6 prin legătură dublă. Forma amină, mai stabilă energetic, se întâlnește în mod obișnuit în acizii nucleici. Prin migrarea unui atom de hidrogen (mișcare tautomeră) din grupa amina (NH2) la N1, dubla legătură dintre N1 și C6 migrează la poziția C6 la azotul fostei grupări amină, iar gruparea amină, pierzând un atom de azot, devine imină.

Stările tautomerice sunt foarte importante pentru fenomenul ereditar, deoarece ele condiționează direct configurația legăturilor de hidrogen și stabilirea lor specifică, potrivit complementarității oferite de stările ceto-amino.

Pe de altă parte, stările tautomerice imină și enol schimbă complet configurația de complementaritate marginală, ceea ce conduce la alterarea specificității de împerechere. Astfel, citozina, în starea tautomerică imină, se împerechează cu adenina, cu formarea a două punți de hidrogen. Se formează astfel perechi nespecifice de baze azotate, diferite de perechile Watson-Crick (A=T si G=C).

Perechi nespecifice de baze azotate se realizează și în cazul celorlalte stări tautomerice, prin alterarea proprietăților de împerechere. Prin aceasta se crează posibilitatea apariției de modificări în secvența de baze azotate din ADN, ceea ce echivalează cu modificarea informației genetice, deci cu apariția mutatiei. Mișcarea tautomerică stă astfel la baza genezei mutației spontane. Prin proprietatea sa de a prezenta mișcare tautomeră, ADN poartă în sine, în structura intrinsecă a bazelor sale azotate, posibilitatea mutației.

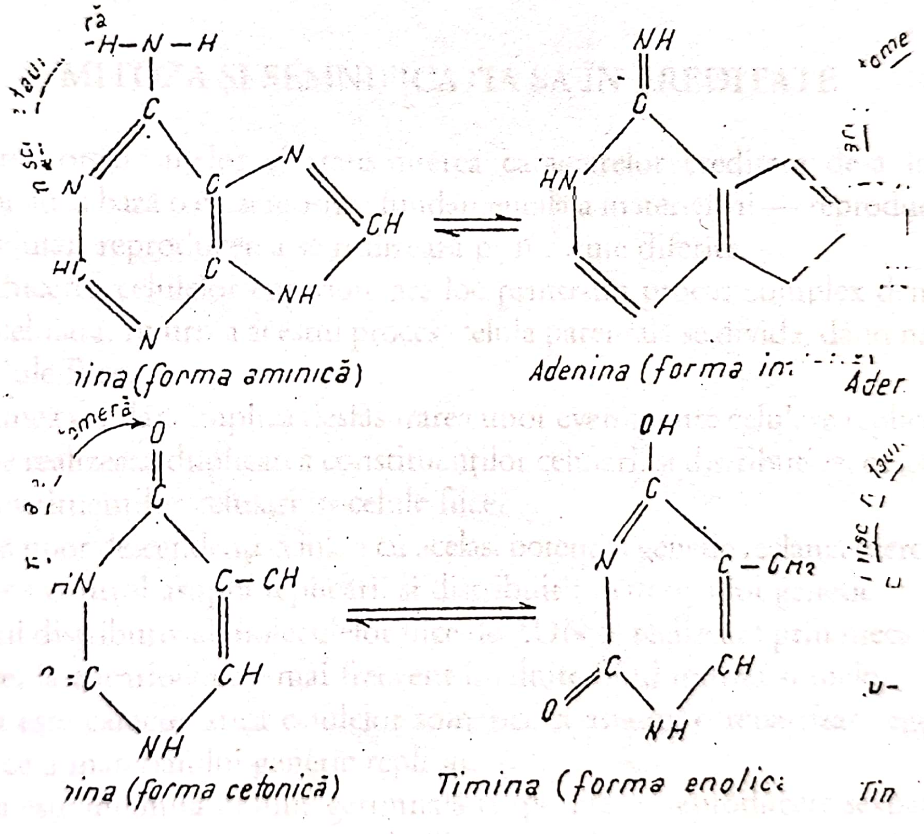

H–N–H
NH
C
N
HC
NH
CH
HN
ina (forma aminică)
Adenina (forma im
Ader
O
OH
HN
C–CH
C–CH3
CH
NH
ina (forma cetonică)
Timina (forma enolic
Tin

Fig. 9 — Tautomeria bazelor.

CAPITOLUL II

DINAMICA CELULARĂ A GENOMULUI (DIVIZIUNEA CELULARĂ)

1. MITOZA ȘI SEMNIFICAȚIA SA ÎN EREDITATE

Creșterea organismelor și transmiterea caracterelor ereditare de-a lungul generațiilor au la bază o caracteristică fundamentală a materiei vii — reproducerea. La nivel celular, reproducerea se realizează prin forme diferite.

Reproducerea celulelor eucariote are loc printr-un proces complex denumit diviziune celulară. În urma acestui proces, celula parentală se divide, dând nastere la două celule fiice.

Diviziunea celulară implică desfășurarea unor evenimente celulare replicative, prin care se realizează duplicarea constituenților celulari, și distributive, ce asigură partiția constituenților celulari în celule fiice.

Apariția unor descendenți celulari cu același potențial genetic reclamă exercitarea unui riguros control asupra replicării și distribuirii materialului genetic.

Procesul distributiv al moleculelor fiice de ADN se realizează prin mecanisme specializate, la eucariote cele mai frecvent întâlnite fiind mitoza și meioza.

Mitoza este caracteristică celulelor somatice și asigură o repartizare egală în celulele fiice a materialului genetic replicat.

Meioza este întâlnită în linia germinală la speciile cu reproducere sexuată. În urma meiozei se formează patru celule fiice (gameții), fiecare prezentând un set complet de informație ereditară caracteristic speciei, fiecare genă fiind prezentă însă, doar într-un singur exemplar. Prin fuziunea gameților de sex opus (spermatozoidul și ovulul), ia naștere oul fecundat din care se dezvoltă ulterior întregul organism multicelular, prin diviziuni celulare succesive și complexe mecanisme de determinare și diferențiere celulară.

Reproducerea celulară implică evenimente multiple și complexe ce se succed ciclic și care constituie ciclul celular. Funcție de compartimentele celulare în care se desfașoară aceste evenimente, se disting două componente ale ciclului celular: ciclul cromozomal si ciclul citoplasmatic.

În ciclul cromozomal, replicarea ADN alternează cu mitoza.

Principalele evenimente ale ciclului citoplasmatic sunt dublarea constituenților celulari și citokineza –, proces prin care celula parentala se scindează. Ambele componente ale ciclului celular se află într-o relație de strânsă interdependență.

Mitoza și citokineza ocupă o scurtă perioada de timp (10%) din durata desfașurării ciclului celular, numita perioada mitotica (M). Perioadele mitotice succesive sunt separate de interfază (interkineza) (fig. 1).

Considerată multă vreme un interludiu al mitozei, lipsită fiind de evenimente celulare, interfaza constituie perioada ciclului celular în care se desfașoară o susținută

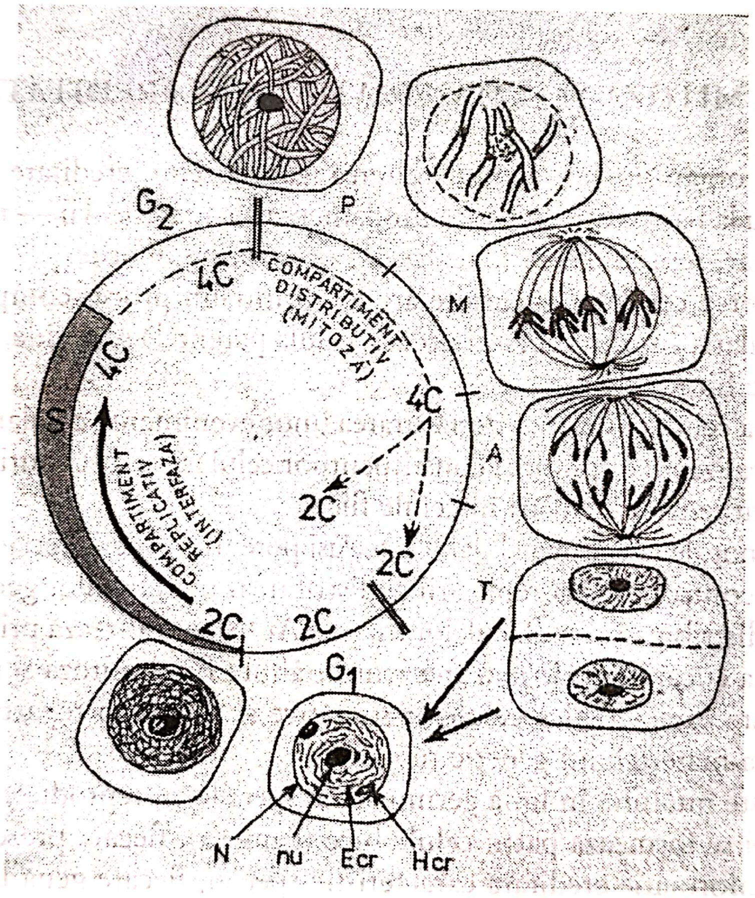

G2
P
M
A
T
G1
S
4C
4C
4C
2C
2C
2C
2C
COMPARTIMENT DISTRIBUTIV (MITOZĂ)
COMPARTIMENT REPLICATIV (INTERFAZĂ)
N
nu
Ecr
Hcr

Fig. 1 — Ciclul celular. P =Profaza ; M= Metafaza ; A= Anafaza ; T = Telofaza ; G_1= primul gol sintetic ; G_2= al doilea gol sintetic ; S = perioada sintetică ; N= nucleu ; nu = nucleol ; Ecr= eucromatină ; Hcr = heterocromatină. În perioada sintetică, cantitatea de ADN crește de la nivelul diploid 2C, trecând prin etape intermediare 2,5C, 3C; 3,5C, până ajunge la nivelul 4C, moment în care, prin mecanisme foarte exacte de reglaj celular, încă necunoscute, este încetată sinteza de material genetic (original)

activitate biosintetică (sinteza de ADN, de ARN și de proteine) asigurând condițiile realizării diviziunii celulare.

Interfaza ocupă cea mai mare parte din durata ciclului celular (90%). În cadrul acestei etape au fost descrise trei perioade distincte:

Perioada G1 (*gap* = gol) sau presintetică a fost considerată inițial ca o perioadă de gol sintetic. Ulterior, s-a constatat că în G1 are loc o intensificare a transcripției și proteosintezei, procese aproape blocate în perioada mitotică. Principalele evenimente ce caracterizează perioada G1 sunt desăvârșirea decondensării cromatinei (proces inițiat în anafază) și reorganizarea nucleolului prin reluarea sintezei de ARNr. Fiecare cromozom este monocromatidic fiind alcătuit dintr-o singură moleculă de ADN dublu catenară asociată celorlalte componente moleculare ale sale.

Perioada S sau sintetică urmează perioadei G1. Pe întreaga durată a perioadei S se realizează replicarea ADN nuclear, astfel încât, la sfârșitul ei, cantitatea de ADN nuclear se dublează. În acest moment, cromozomii sunt bicromatidici, fiecare fiind alcatuit din două cromatide surori, la nivelul fiecăreia existând câte un dublu-helix ADN. Simultan cu replicarea materialului genetic se desfașoară sinteza proteinelor histone și nonhistone, acestea din urmă fiind implicate în sinteza ADN (ADN polimeraze, ADN ligaza, helicaza, topoizomeraze, etc).

Perioada G2 se mai numește perioada postsintetica. În această perioadă, transcripția și proteosinteza au aceeași intensitate ca în G1, asigurându-se condițiile necesare intrării celulei în mitoză. Cromozomii bicromatidici prezintă un grad redus de condensare, nucleolul are mărimea maximă, iar volumul nucleului crește.

Durata ciclului celular variază în funcție de tipul celulelor, specie și stadiu de dezvoltare embrionară.

Spre deosebire de perioada S, a cărei durată este constantă, în raport cu intervalul de timp corespunzător interfazei, perioada G1 are o durata foarte variabilă.

S-a constatat că timpul necesar parcurgerii etapei G1 este influențat de o serie de factori extracelulari, cum ar fi elementele nutritive și factorii de creștere. Deoarece desfășurarea perioadei sintetice nu pare afectată de acești factori, se sugerează existența unui punct critic la granița dintre G1 și S, numit START.

Pentru majoritatea celulelor eucariote, depășirea punctului start (echivalent la mamifere cu *punctul de restricție*) marchează angajarea celulei de drojdie în parcurgerea întregului ciclu celular.

O celulă privată de factori de creștere își va întrerupe ciclul celular, până în momentul adăugării acestora în mediul de cultură. Timpul scurs de la reintroducerea în mediu a factorilor de creștere până la intrarea celulei în perioada sintetică este de obicei cu câteva ore mai lung decât durata perioadei G1, în condiții normale.

Lipsa factorilor de creștere determină modificări metabolice celulare profunde, însoțite de intrarea celulei într-o stare neproliferativă, ceea ce face imposibilă depășirea punctului start.

Celulele blocate în perioada G1 a ciclului celular, incapabile de a trece peste punctul start, sunt celulele aflate în G0.

Depășirea perioadei G1 de către celulele organismelor pluricelulare este condiționată de atingerea dimensiunii standard.

Există foarte puține indicii cu privire la modalitatea prin care celulele sunt capabile să-și sesizeze propria dimensiune. Dată fiind relația de proporționalitate și gradul său de ploidie, s-a sugerat că raportul dintre volumul celulelor și cantitatea totală de ADN sau numărul seturilor de gene din genomul celulelor ar constitui un factor critic. Mecanismul prin care dimensiunea celulei influențează ciclul cromozomal implică probabil sinteza unei molecule într-o manieră dependentă de cantitatea de ADN celular. În aceste condiții, raportul dintre cantitatea totală a moleculei și ADN celular ramâne constantă . Scăderea concentrației moleculei sub o valoare prag, determinată de creșterea volumului celular, ar putea constitui un semnal de depășire al punctului de restricție și de inițiere a replicării ADN.

În organismele pluricelulare, numeroase celule se găsesc în stadiul G0. În aceste celule, raportul dintre sinteza și degradarea proteinelor este modificat în comparație cu cel al celulelor proliferative, aflate în perioada G1. Atât aparatul proteosintetic (ribozomi, ARNm) cât și viteza sintezei proteinice a acestui proces, sunt mult diminuate. Celula își sintetizează proteinele de întreținere ramânând viabilă, dar nu mai crește. În urma stimularii cu factori de creștere a celulelor aflate în G0, se constată o intensificare a proteosintezei, ea evoluând paralel cu ciclul cromozomal.

Legatura dintre creșterea și proliferarea celulara nu e rigidă. Afirmația se bazează pe rezultatele experientelor pe culturi de celule în care s-a reușit blocarea sintezei proteinice fără ca ciclul cromozomal să fie afectat și invers. De asemenea, pentru unele celule aflate în G0 (de exemplu, neuronii) creșterea celulară nu reclamă replicarea ADN.

În cea de a patra perioadă a ciclului celular, perioada mitotică, au loc procese distributive de repartizare în celulele fiice a constituenților celulari sintetizați în interfază. Totalitatea acestor procese poartă numele de diviziune mitotică sau cariokineză, ultima denumire fiind sugerată de schimbările majore ce au loc la nivelul nucleului celular.

Desfășurarea diviziunii mitotice necesită diferențierea în spațiul intracelular a aparatului mitotic. Acesta e alcătuit din două componente: aparatul cromatic (cromozomii) și aparatul acromatic (fusul de diviziune și centrii celulari).

În funcție de modul de desfășurare se deosebesc două tipuri de diviziune celulară: mitoza și meioza.

Mitoza –(mithos = ață,fir) constituie tipul de diviziune caracteristic celulelor somatice ale tuturor organismelor eucariote. Ea este denumită și diviziune ecvațională, deoarece, în cadrul ei, celula își conservă garnitura cromozomală inițială, celulele fiice prezentând același număr de cromozomi ca și celulele parentale.

Formula mitozei este: $2n \rightarrow 4n \begin{array}{l} - 2n \\ \searrow 2n \end{array}$

Mitoza poate fi împărțită în cinci etape, caracterizate prin modificări morfologice specifice: profaza, metafaza, anafaza, telofaza, citokineza, aceasta din urmă debutând în anafază și încheindu-se la sfârșitul ciclului celular.

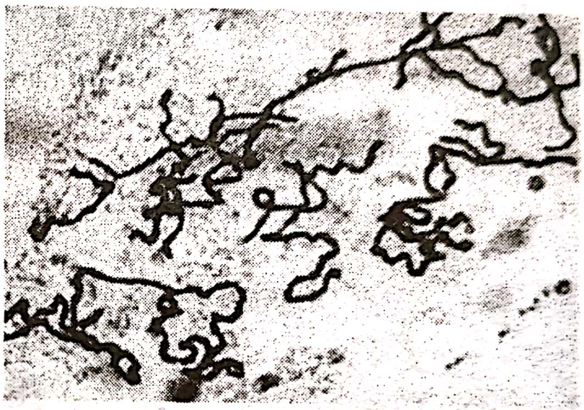


Fig. 2A — Cromozomi profazici la *Allium cepa* (original).

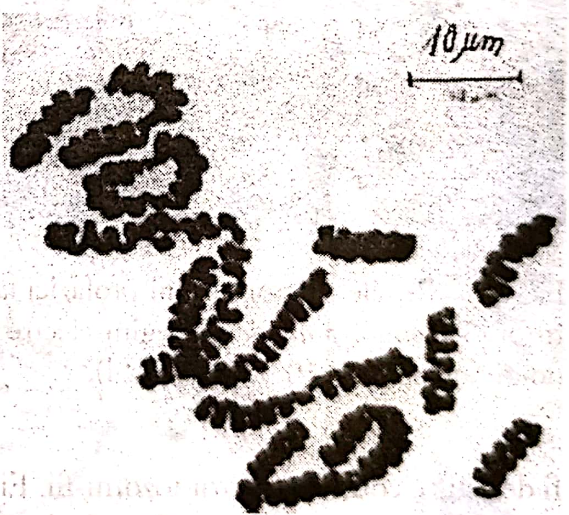


Fig. 2B — Cromozomi de *Trandescantia virginiana*. Spiralizarea cromozomilor metafazici se poate evidenția prin tehnici speciale (tratament cu vapori de amoniac) (după Vosa, Clowes și Juniper, 1968)

Profaza (fig. 2) se caracterizează prin condensarea cromatinei și individualizarea cromozomilor sub forma unor filamente subțiri, duble și atașate pe fața endoplasmatică a membranei interne a anvelopei nucleare. Cele două cromatide ce alcătuiesc cromozomul sunt unite la nivelul centromerului și sunt strâns răsucite una în jurul celeilalte (spiralizare plectonemică). Condensarea cromatinei continuă pe toată durata profazei, ducând la scurtarea și îngroșarea progresivă a filamentelor cromatidice.

La începutul profazei, centrul celular se divide, generând doi centrii celulari. Fiecare dintre aceștia conține câte o pereche de centrioli din care unul matur și altul în creștere. Centrii celulari rezultați se deplasează spre polii opuși ai celulei. Concomitent se înregistrează dezorganizarea microtuburilor citoplasmatici –, parte componentă a citoscheletului interfazic – și apariția fusului de diviziune care este o structură bipolară alcătuită din microtubuli și proteine asociate fiind dispus între cei doi centrii celulari.

Creșterea gradului de condensare a cromatinei e însoțită de o încetinire a

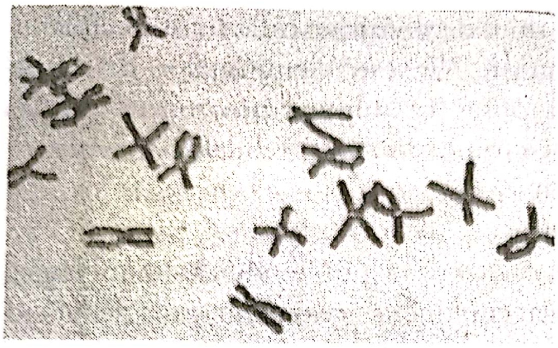


Fig. 3 — Cromozomi metafazici la *Allium cepa*, cu centromeri bine evidențiați (zona necolorată din partea centrală a „figurilor în X“ apărute ca urmare a acțiunii statmokinetice a lindanului) (original).

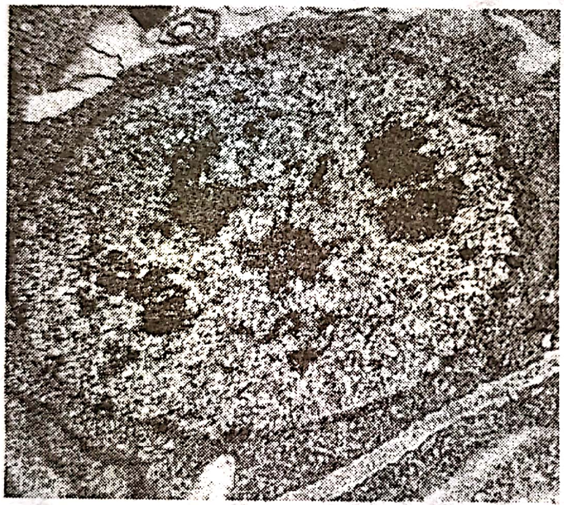


Fig. 4 — Profile de cromozomi profazici la trifoi (*Trifolium pratense*). Imagini electronomicroscopică X 10.000 (original).

proceselor de transcripție și de sinteză proteică. Principalele proteine sintetizate în profaza timpurie și mijlocie sunt cele implicate în condensarea cromatinei și edificarea aparatului acromatic (fusul de diviziune).

Scăderea gradată a procesului transcripțional determină inițial micșorarea volumului nucleolar și, ulterior, la sfârșitul profazei, fragmentarea și completa sa dezorganizare, ca urmare a blocării sintezei ARN.

Metafaza este inertă din punct de vedere sintetic, cromatina atingând condensarea maximă și cromozomii fiind cel mai bine evidențiați (fig. 3).

Cromatidele surori ale cromozomului metafazic sunt situate una alături de cealaltă, într-o dispoziție paralelă.

Fibrele kinetocorice aliniază cromozomii într-un singur plan iar acesta este perpendicular pe axa fusului de diviziune și localizat la jumătatea distanței ce separă polii celulei, formând placa ecuatorială sau metafazică.

La sfârșitul metafazei are loc desăvârșirea reduplicării centromerilor, ceea ce are drept consecință clivarea acestora însoțită de inițierea separării cromatidelor surori ale cromozomului.

La debutul *anafazei* este desăvârșită separarea cromatidelor surori acestea devenind cromozomi anafazici care pot fi de acum, considerați cromozomi-fii. Ei sunt monocromatidici și, de regulă, suferă un proces de decondensare, însoțit de creșterea lor în lungime. În cursul anafazei, cromozomii-fii se află grupați în două grupe de cromozomi fii, distribuite echidistant între ecuator și poli, unde ajung la sfârșitul anafazei și începutul telofazei.

În telofază cromozomii-fii ajung la polii fusului de diviziune și sunt supuși unor procese inverse celor din profaza: decondensarea cromozomilor, asociată cu pierderea aparentă a individualității lor. Dacă la începutul telofazei ei au aspectul unor fibre fine, alungite și încolăcite în fel și chip, la fiecare pol al celulei , spre sfârșitul ei, cromatina își reia aspectul caracteristic interfazei, aceasta devenind difuză, astfel că, și la microscop, cromozomii nu mai pot fi identificați, deși ei se mențin ca entități discrete, care își conservă integritatea structurală.

La nivel nuclear, reîncepe sinteza ARN, iar în citoplasmă procesul de proteinosinteză se intensifică.

În telofază se reface membrana nucleară în jurul cromozomilor ajunși la cei doi poli.

Citokineza este fenomenul de diviziune a citoplasmei. La celulele animale, diviziunea citoplasmatică se realizează prin clivare. Locul de clivare devine vizibil încă din anafază, sub forma unei adâncituri (șanț), pe suprafața membranei plasmatice. El este situat în planul plăcii ecuatoriale, perpendicular pe fusul de diviziune.

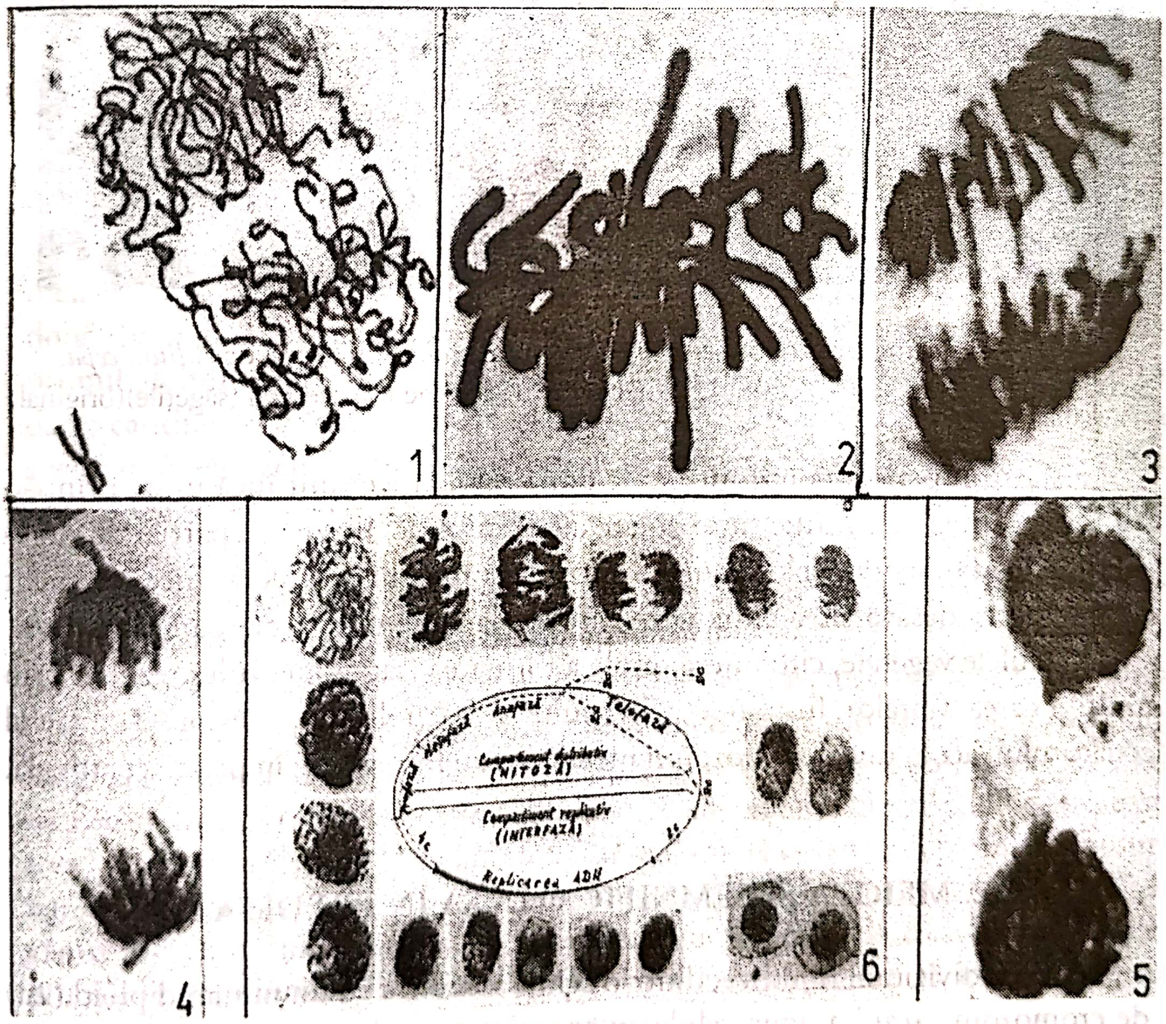

1
2
3
4
6
5
Anafază
Telofază
Compartiment distributiv (MITOZĂ)
Compartiment replicativ (INTERFAZĂ)
Replicarea ADN

Fig. 5 — Fazele diviziunii mitotice: 5.1 Profază, 5.2 Metafază, 5.3 Anafază, 5.4 Telofază, 5.5 Citokineză, 5.6 Diagrama ciclului celular mitotic (original).

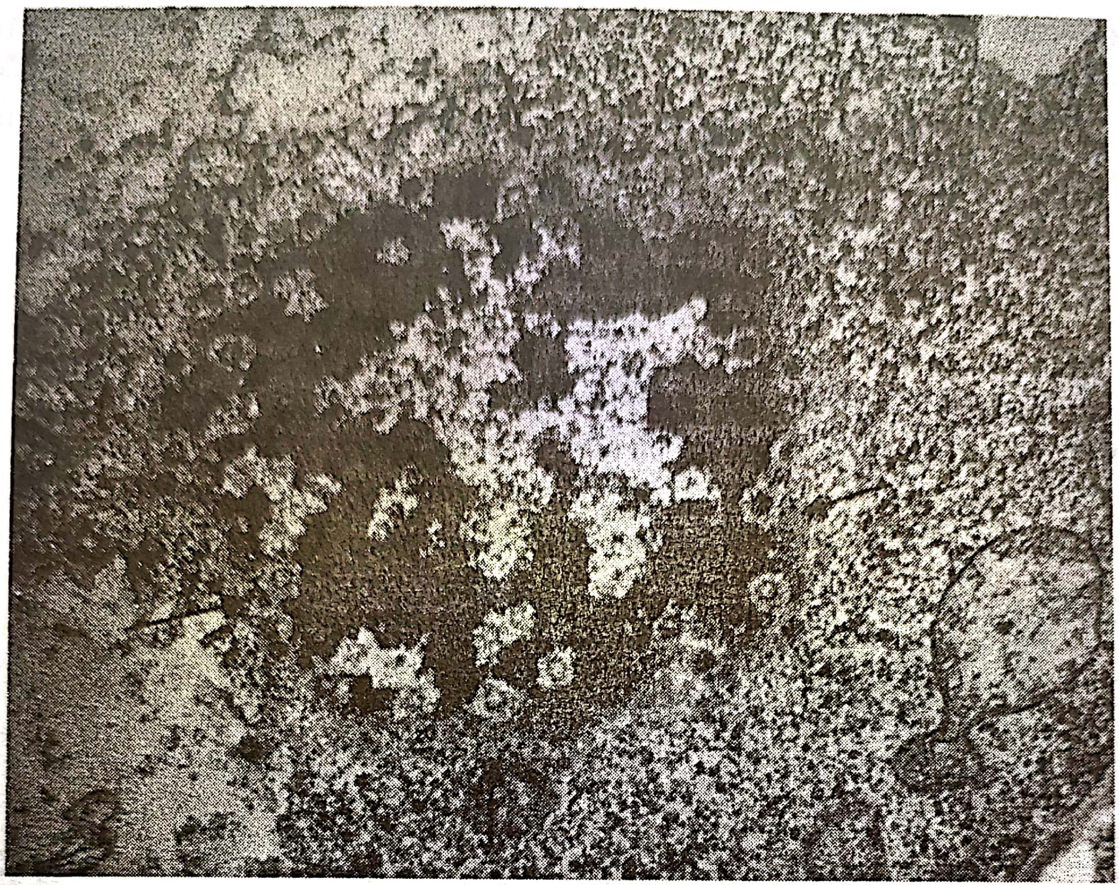


Fig. 6 — Imagine electronomicroscopică a cromozomilor mitotici de *Allium cepa*. Se observa prezența fibrelor fusului de diviziune în secțiune transversală (săgețile)(original)

La sfârșitul perioadei mitotice, cele două celule fiice sunt încă unite printr-o regiune centrală ce conține fibre polare ale fusului de diviziune, parțial dezorganizate, înconjurate de hialoplasmă. Separarea completă a celulelor fiice, moment ce marchează desăvârșirea citokinezei, are loc la începutul următoarei interfaze.

În celulele vegetale, citokineza implică formarea fragmoplastului rezultat prin multiplicarea fibrelor fusului de diviziune și vacuolizarea acestora la nivelul ecuatorului, acolo unde cromozomii metafazici au fost așezați în placa ecuatorială.

2. MEIOZA ȘI SEMNIFICAȚIA SA ÎN EREDITATE

În urma diviziunii mitotice, dintr-o celulă somatică cu un număr diploid (2n) de cromozomi, rezultă două celule cu același număr de cromozomi. Dacă acest mecanism ar sta la baza diferențierii celulelor sexuale, ar însemna ca și gameții să aibă același număr de cromozomi (diploid) pe care îl au celulele somatice. Dar, cum reproducerea sexuată implică fuzionarea a două celule sexuate, ar însemna ca numărul cromozomilor din zigot — ovulul fecundat- să crească, dublându-se la fiecare generație situație incompatibilă ca existența normală a speciilor. Există însă un proces de diviziune specific formării celulelor sexuale (gametogeneza) care determină păstrarea constantă a numărului de cromozomi de-a lungul generațiilor. Acest proces e numit meioză sau proces meiotic și a fost studiat prima dată de către Farmer și Moor, în anul 1905.

Procesul meiotic constă din esență, în două diviziuni celulare care se succed foarte rapid, numite meioză primară și meioză secundară.

Procesul meiotic se întâlnește la organismele eucariote, cu înmulțire sexuată și constituie o etapă a procesului de gametogeneză, adică de formare a spermatozoizilor (spermatogeneza) și a ovulelor (ovogeneza).

În linii mari, și în special, în privința modului de comportare al cromozomilor, procesul de formare a spermatozoizilor și ovulelor este asemănător.

In procesul de formare a gameților, se pornește de la o categorie de celule numite spermatogonii și, respectiv, ovogonii. Ambele categorii de celule inițiale sau stem germinale au caracteristicile unor celule somatice, care se divid mitotic, astfel că, numărul lor de cromozomi este diploid (2n). La intrarea în ciclul meiotic, atât spermatogoniile, cât și ovogoniile își măresc volumul, dând celule meiocite denumite spermatocite primare și respectiv ovocite primare. Acestea desfășoară procesul meiotic, și la sfârșitul meiozei primare, din fiecare spermatocită primară rezultă două spermatocite secundare, iar dintr-o ovocită primară, o ovocită secundară și primul globul polar, care este mai mic, având, ca și acesta un nucleu haploid (n) dar o cantitate mai redusă de citoplasmă, comparativ cu ovocita secundară. Atât spermatocitele secundare cât și ovocitele secundare se caracterizează prin faptul că în nucleul lor numărul cromozomilor este redus la jumătate (n) față de cel din celulele somatice (2n).

Profaza primei diviziuni meiotice cuprinde cinci etape care se succed neîntrerupt : leptoten, zigoten, pachiten, diploten, diakineza.

În **leptoten** (leptos = subțire, nema = fibră) se constată o creștere a volumului nucleului celulei, iar cromozomii încep să se diferențieze sub forma unor filamente lungi și subțiri, abia vizibile la microscop. Numărul cromozomilor este diploid, iar fiecare cromozom este monocromatidic. Aranjamentul cromozomilor în acestă fază nu este întotdeauna la întâmplare. În majoritatea cazurilor, cromozomii sunt oarecum polarizați, brațele lor fiind îndreptate spre acea parte unde este localizat centrozomul. Se pare că există o anumită atracție spre centrozom și porțiunea terminală a cromozomilor. Este posibil ca acestă polarizare să joace un rol în formarea sinapselor cromozomale, în etapa următoare.

În **zigoten,** cromozomii omologi se alipesc unul de altul, pe toată întinderea lor, rezultând entități cromozomale numite *bivalenți*. Fenomenul respectiv poartă denumirea de *sinapsă cromozomală*. Datorita faptului că sinapsa cromozomală este extrem de exactă și de intimă, fiecare element structural alipindu-se pe elementul similar din cromozomul omolog, numai aparent, numărul cromozomilor s-a redus la jumătate. Realizarea sinapsei are o deosebită importanță genetică. În primul rând, se creează premisa că la sfârșitul meiozei primare, fiecare membru al perechii de omologi să aibă posibilitatea de a trece în una din cele doua celule fiice rezultate, realizându-se astfel, setul haploid de cromozomi (n), precum și o repartizare egală a materialului genetic între cele două celule fiice. Dacă acestă sinapsă a cromozomilor omologi nu ar avea loc, atunci repartizarea cromozomilor între celulele fiice ar fi haotică, rezultând celule fiice cu unii dintre cromozomi dar, lipsindu-le alți cromozomi. Aceasta ar face ca și cele două celule fiice să posede material genetic diferit respectiv informație genetică diferită, absența unor cromozomi putând conduce la neviabilitatea celulei respective. Datorită justapunerii perfecte a cromozomilor în sinapsă, se pot evidenția cazuri de cromozomi anormali, care au suferit un proces de rupere, de pierdere, de inversie și de duplicație a unor segmente. Dacă de pe un cromozom lipsește un segment, atunci în timpul sinapsei, cromozomul omolog normal negăsind segmentul respectiv pentru a realiza sinapsa, va suferi, în zona acelui segment, o îndoire, o buclare, în cazul în care segmentul lipsă nu este terminal, sau va prezenta o porțiune liberă, atunci când segmentul lipsă de pe un omolog este terminal.

Sinapsa cromozomilor în meioză oferă singura ocazie când se poate stabili în mod cert, identitatea a doi cromozomi, fapt important pentru studiile de genetică.

Spre deosebire de cromozomii omologi, care se unesc latură pe latură (*side by side*) pentru a forma bivalenții, în spermatogeneză cromozomii X și Y se dispun cap la cap ("*end to end*") la nivelul brațelor scurte, delimitând așa numitul *corpuscul sexual* sau *corpuscul X-Y*, observat în această etapă. În zona de formare a sinapsei între X și Y sunt prezente genele similare, această regiune a cromoyomilor X și Y care prezintă omologie numindu-se regiune pseudoautozomală. Există o regiune pseudoautozomală la capătul brațelor scurte ale cromozomului X și Y și o a doua regiune pseudoautozomală la capetele brațelor lungi ale acestor doi heterozomi X și Y. În rest, cei doi heterozomi X și Y sunt neomologi. La nivelul regiunii pseudoautozomale de la capetele brețelor scurte

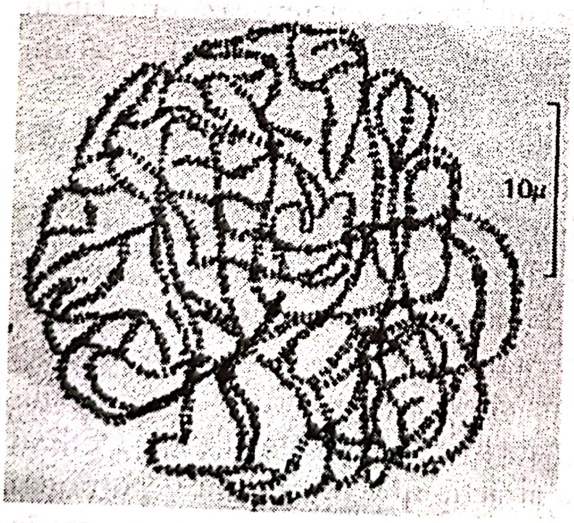


Fig. 7 — Organizarea cromomerică a cromozomilor pachitenici de crin *Lilium pardalinum* (din J. Belling, 1928).

ale cromozomilor X și Y se realizează sinapsa cromozomală, are loc asamblarea unui mic *complex sinaptonemal* și are loc procesul de crossing-over.

În **pachiten** (pachis = gros) cromozomii încep să se scurteze, să se îngroașe; sinapsa dintre cromozomii omologi devine tot mai stânsă, iar structura dublă a cromozomilor omologi cu greu mai poate fi identificată.

Se păstreză încă corpusculul sexual.

În pachiten, cromozomii omologi din bivalent sunt complet și intim asociați, datorită prezenței a două structuri caracteristice: *complexul sinaptonemal* și *chiasmele*.

Complexele sinaptonemale tipice sunt caracteristice pentru pachiten, însă, parțial, ele pot fi observate la microscopul electronic în leptoten și zigoten. În

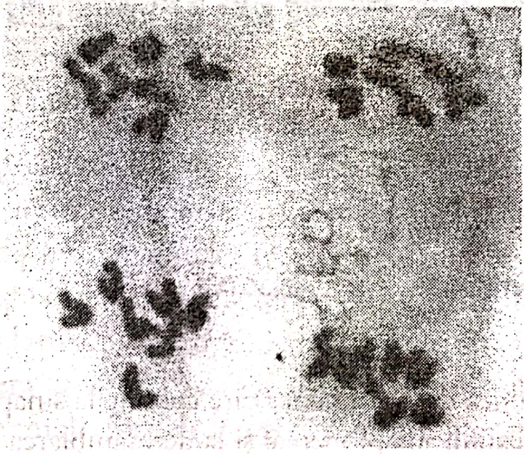


Fig. 8 — Repartizarea echilibrată a cromozomilor în meioză, la *Secale cereale* 2n=14 (telofaza II) (original)

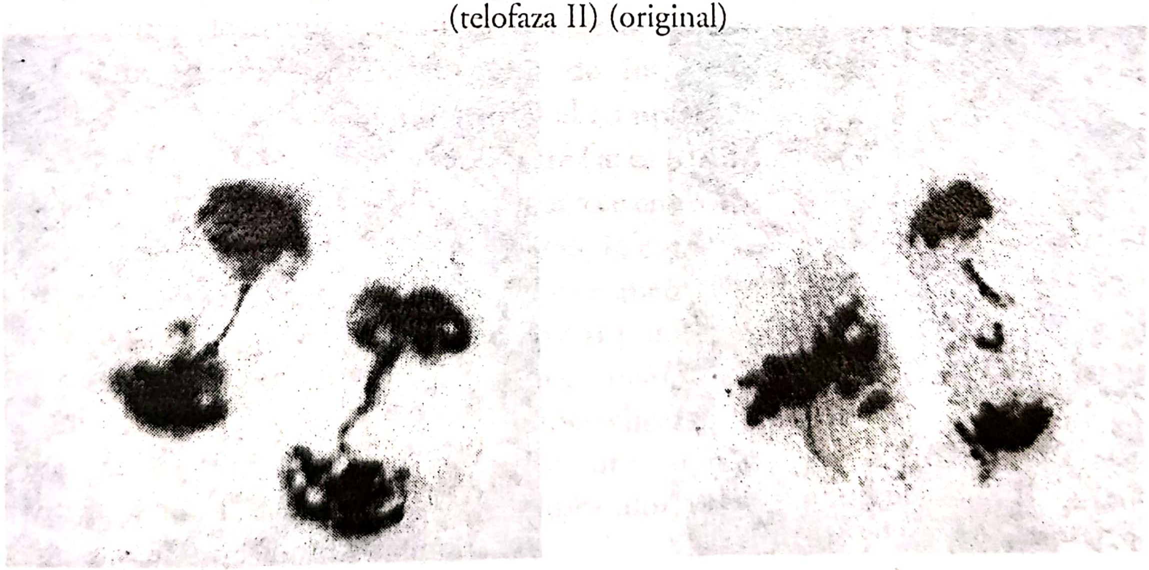


Fig. 9 — Anomalii meiotice la *Triticale :* A) punți cromatice, B)cromozom rămas ca univalent (stânga), punți cromatice și cromozomi retardatari (dreapta) (original).

leptoten, cromozomii neîmperecheați dezvoltă axe singulare, dense, fiecare dintre ele corespunzând unui element lateral al viitorului complex sinaptonemal. În pachiten, complexele sinaptonemale pe deplin formate pot fi găsite de-a lungul întregii lungimi a cromozomilor omologi. În diploten, complexele sinaptonemale se dezagregă repede, pe măsură ce cromozomii omologi se îndepărtează și chiasmele interstițiale suferă migrare spre capetele bivalentului, proces numit TERMINALIZAREA CHIASMELOR.

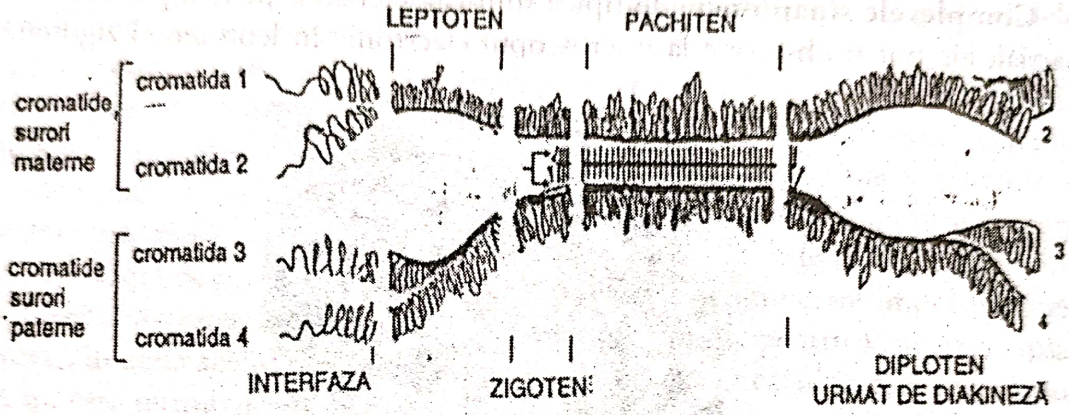

LEPTOTEN
PACHITEN
cromatide surori materne
cromatida 1
cromatida 2
cromatide surori paterne
cromatida 3
cromatida 4
1
2
3
4
INTERFAZA
ZIGOTEN
DIPLOTEN URMAT DE DIAKINEZĂ

Fig. 10 — Succesiunea de evenimente care conduc la sinapsa cromozomală, la asamblarea complexului sinaptonemal și la dezasamblarea acestuia la sfârșitul diplotenului (după Alberts și colaboratorii, 1994)

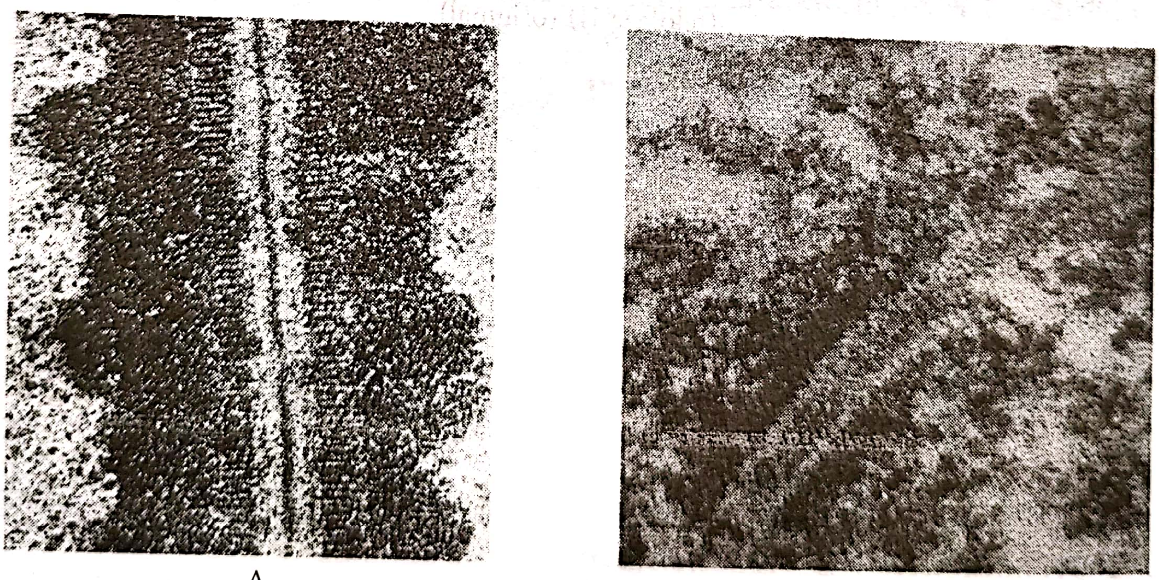

A
B

Fig. 10 — Complexe sinaptonemale A) la *Neotiella rutilans* (după Westergaard și Wettstein, 1970); B) la *Bombyx mori* A X 96.000 (original)

Complexul sinaptonemal constă într-o axă proteinică lungă, scalariformă, pe ale cărei laturi opuse, cei doi omologi sunt strâns alipiți, formând o pereche liniară de cromozomi, reprezentând bivalentul. Cromatidele surori, în fiecare omolog, sunt menținute strâns împachetate, ADN-ul lor extinzându-se în afară, de pe aceeași latură a structurii proteinice scalariforme, sub forma unor seturi de bucle. Astfel, pe când cromozomii omologi sunt strâns aliniați de-a lungul lor în complexul sinaptonemal, cromatidele materne și paterne, care se vor recombina, sunt păstrate separat, pe fiecare latură a scării proteinice ce reprezintă complexul sinaptonemal, la mai mult de 1000 nm .

Natura exactă a evenimentelor care conduc la sinapsa cromozomală încă nu e clară. Se crede că pregătirea cromozomilor omologi pentru împerechere se realizează prin atașarea capetelor cromozomilor (telomerele) la așa numitele „situsuri de atașare“, de pe anvelopa nucleară, care după Cumings (1968) sunt evidente în nucleul interfazic, unele putând corespunde punctelor de inițiere a sintezei ADN în fiecare rundă de replicare.

Studiile citologice arată că sinapsa cromozomală este precedată de formarea unei axe baghetiforme proteinice, de-a lungul fiecărui omolog, în spațiul dintre cromatidele surori, după care, aceasta suferă o transpoziție în afara cromozomilor ramânând atașată pe o latură a acestora. Pe măsură ce împerecherea se desfașoară, aceste axe apar a adera una la cealaltă, spre a deveni elementele laterale ale complexului sinaptonemal, formând cele 2 laturi ale structurii scalariforme protenice. Atât axele cât și elementele laterale, conțin o proteină cu proprietăți unice de colorare argentică, care fac ca aceste structuri să fie vizibile atât în microscopie electronică cât și în microscopie optică. Din axele laterale sunt proiectate spre interiorul spațiului de împerechere, fibre fine, care prin interdigitare vor da elementul central al complexului sinaptonemal.

Nu se cunoaște care sunt cauzele care fac ca părțile omoloage ale cromozomilor să devină precis aliniate în zigoten. Deoarece cromatina unui omolog e poziționată la distanță de cromatina partenerului său, în complexul sinaptonemal, s-a sugerat că specificitatea pentru împerechere este mediată de însăși axele complexului sinaptonemal. Proteinele din aceste axe ar putea mai înâti să se asambleze într-o conformație dictată exact de structura cromatinei, la diferite puncte de-a lungul fiecărui cromozom. Dacă axele se împerechează ulterior, una cu cealaltă, după un mecanism « asemănător cu asemănător », alinierea axelor ar putea, indirect, să alinieze regiuni omoloage ale cromozomilor atașați la ele, potrivit structurilor cromatinei care se împerechează.

Deși complexele sinaptonemale oferă cadrul structural necesar pentru evenimentele de recombinare, ele probabil nu participă la aceste procese, în mod direct. Procesul activ de recombinare se crede că este mediat de *nodulii de recombinare* care sunt fie sferici, fie elipsoidali, fie sub formă de bară, reprezentând ansambluri de proteine, cu un diametru de circa 90 nm. Se crede că ei marchează situsul unei « mașini de recombinare », o multienzimă care apropie în intimă vecinătate regiunile locale ale ADN de pe cromatidele maternă și paternă, pe complexul sinaptonemal.

Dovada asupra funcției recombinaționale a acestei structuri (nodulul de recombinare) este indirectă, dar implicarea sa în proces este susținută de următoarele:

1. numărul total de noduli este aproximativ egal cu numărul total de chiasme care apar ulterior;

2. nodulii sunt distribuiți de-a lungul complexului sinaptonemal asemănător evenimentelor de cross-over; de exemplu, ca și la evenimentele de cross-over, ei sunt absenți din acele regiuni ale complexului sinaptonemal care se asociază cu heterocromatina. Mai mult, măsuratori genetice și citologice arată că apariția unui eveniment de cross-over va împiedica un al doilea cross-over, la oricare situs situat în vecinătate. Tot la fel, nodulii nu pot să apară foarte aproape unul de altul.

3. unele mutante de *Drosophila* prezintă o distribuție anormală a evenimentelor de cross-over de-a lungul cromozomilor, ca și o frecvență de recombinare foarte mult scăzută. La asemenea mutante se întâlnește un număr corespunzator mai mic de noduli de recombinare, cu o distribuție schimbată ce merge în paralel cu distribuția schimbată a cross-overelor. Această corelație sugerează că un nodul de recombinare determină situsul unui eveniment de cross-over.

4. recombinarea genetică se crede că implică o cantitate limitată de sinteză de ADN în zigoten-pachiten, din care rezultă așa-numitul *ADN zyg*, aflat la situsul fiecărui eveniment de cross-over. Autoradiografia electronomicroscopică arată că precursorii radioactivi ai ADN sunt preferențial incorporați în ADN pachitenic la nivelul său, în imediata vecinătate a nodulilor de recombinare. Sinteza reziduală a ADN din profaza meiotică, reprezintă circa 0,3% din ADN genomic. Ea este legată, printre altele, și de procesele reparatorii ale leziunilor ADN, consecutive recombinării intracromozomale (crossing-over-ului).

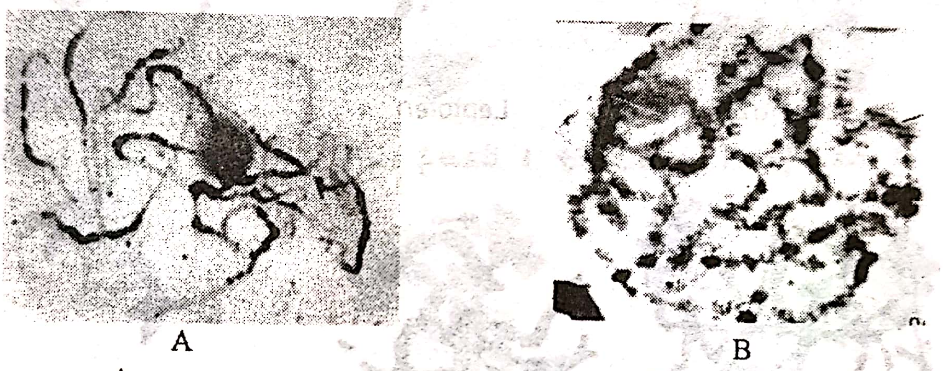
Deoarece există cam tot atâția noduli de recombinare cât numărul evenimentelor de cross-over, rolul lor sugerat în inițierea cross-overului implică faptul că nodulii de recombinare trebuie să fie extrem de eficienți în a determina recombinarea cromatidelor omologilor. Din păcate, nu se știe nimic despre structura sau mecanismul lor de acțiune.

În stadiul de **diploten** (diplos = dublu) cromozomii omologi din fiecare unitate bivalentă, suferă procesul de îndepărtare, fiecare cromozom devenind unitate bicromatidică discretă menținută însă, în bivalent, prin chiasme interstițiale și terminale. Fiecare entitate bivalentă expune acum câte patru cromatide, formațiunea respectivă va fi denumită tetradă cromatidială. Datorită formării tetradei cromatidiale se creează premisele ca la sfârșitul meiozei secundare repartizarea materialului genetic să fie realizată uniform în celulele fiice. De asemenea, tot datorită tetradei, se creează și momentul optim pentru realizarea fenomenului de crossing-over .

În această fază dispare corpusculul sexual, cromozomii X și Y sunt vizibili sub formă de bivalent liniar.

În dictioten (diploten prelungit la femeie) nucleul ovocitelor primare prezintă o conformație caracteristică, de unde și numele său de veziculă germinală.

În **diakineză** (dia = divergent, kinesis =mișcare) cromozomii omologi de la nivelul bivalentului, încep să se îndepărteze unul de altul.



A B

Fig. 11 A) Pachiten (profaza I) la tomate (după Suzuki și colaboratorii, 1986) ; B)Pachiten la șoarece *Mus musculus* (original)

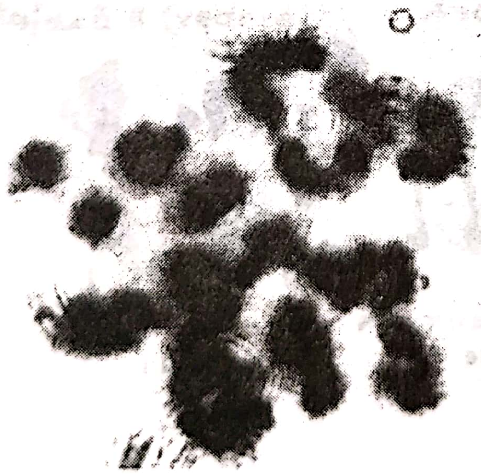


Fig. 12 Diploten spre diakineză la *Mus musculus* (original)

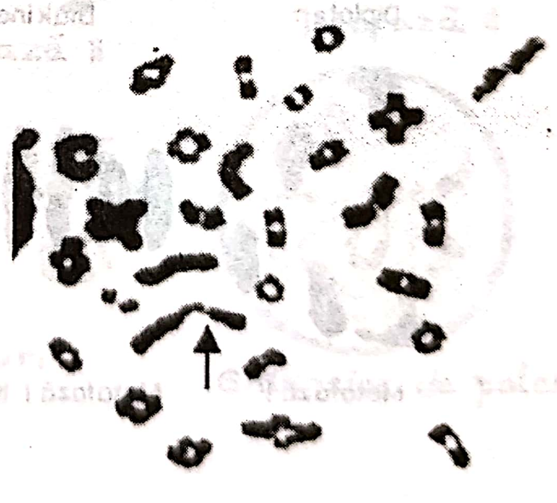


Fig. 13 Diakineză la *Mus musculus* Se constată prezența bivalentului de sex (XY) (săgeata) (original)

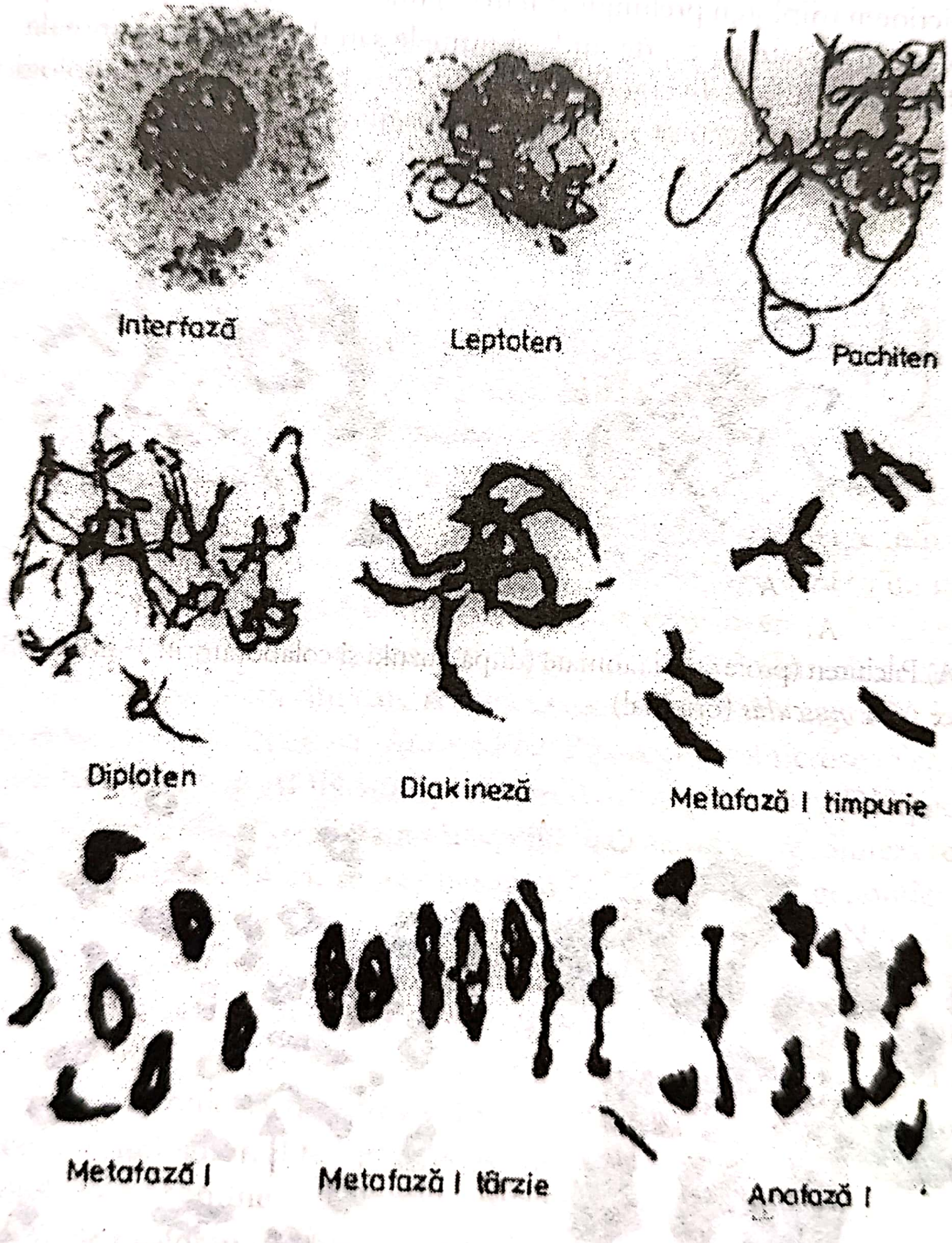

Interfază
Leptoten
Pachiten
Diploten
Diakineză
Metafază I timpurie
Metafază I
Metafază I tîrzie
Anafază I

Fig. 14 — Fazele primei diviziuni meiotice desfășurate în staminele de secară (2n = 14 cromozomi) așa cum pot fi ele văzute și fotografiate la microscopul optic (după G. Kimber, 1982)

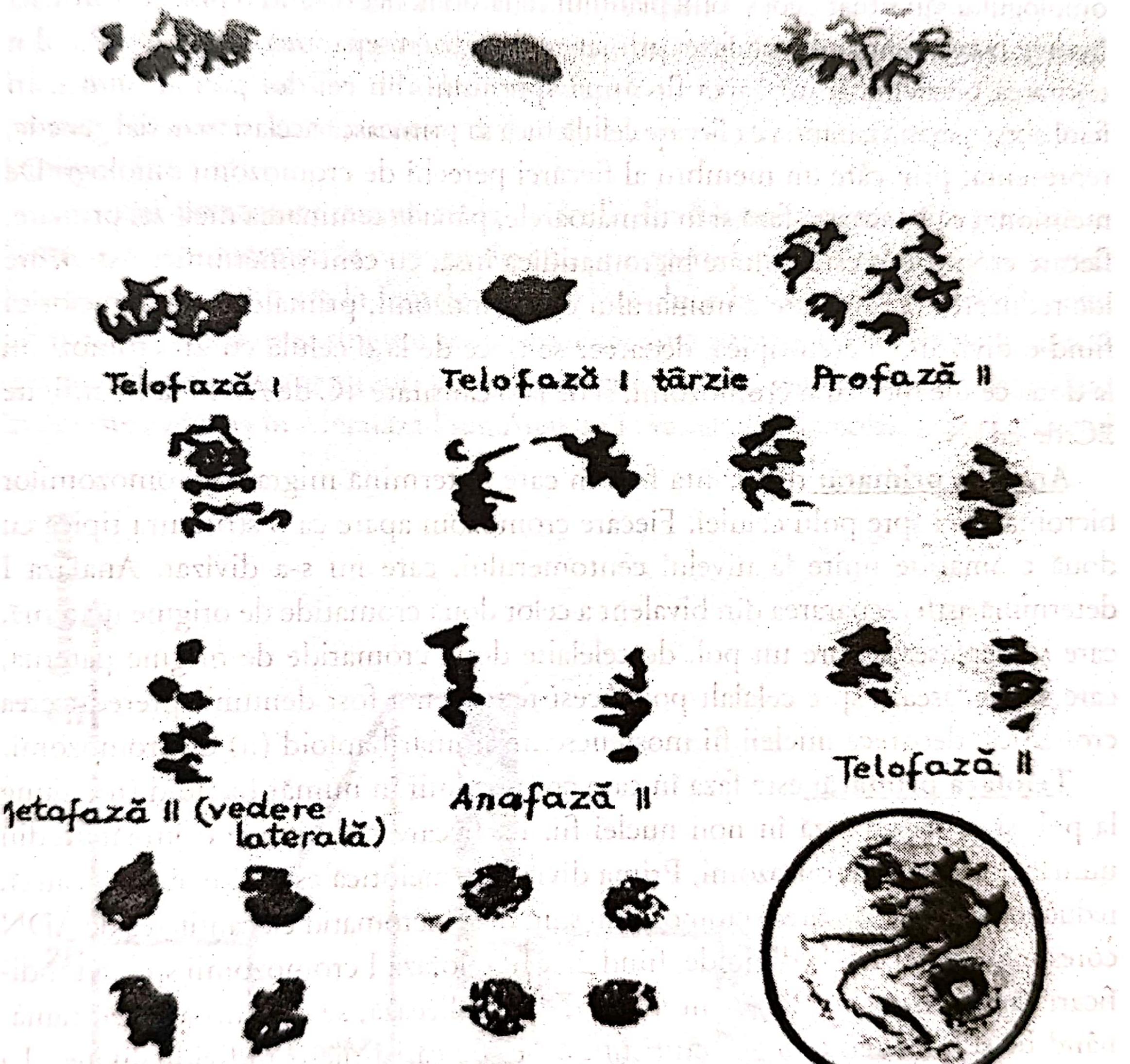

Telofază I
Telofază I târzie
Profază II
etafază II (vedere laterală)
Anafază II
Telofază II
Tetradă cu microspori
Grăuncior de polen

Fig. 15 — Fazele celei de a doua diviziuni meiotice la secara diploidă (2n = 14), care se finalizează cu formarea a patru nuclei haploizi (n=7), fiecare reprezentând nucleul unui microspor (grăuncior de polen) (din Friefelder, 1987).

Metafaza primară: procesele realizate în această fază sunt cele semnalate în mitoză, cu deosebirea că, de data aceasta, fusul nuclear va fi alcătuit dintr-un număr de filamente egal cu numărul unităților bivalente din nucleu. De aceste filamente se va atașa prin intermediul kinetocorilor atașați la centromeri, fiecare entitate cromozomală bivalentă, care se situează în zona centrală a celulei, cu centromerul unui cromozom din bivalent, situat deasupra planului ecuatorial, și cu centromerul omologului său situat dedesubtul planului ecuatorial, neexistând o placă ecuatorială în metafaza I. Sfârșitul metafazei primare coincide cu separarea cromozomilor din entitatea bivalentă și migrarea fiecăruia spre unul din cei doi poli ai celulei. În felul acesta, există garanția ca fiecare celulă fiică să primească același material genetic, reprezentat prin câte un membru al fiecărei perechi de cromozomi omologi. De menționat că în această fază și în următoarele, până la teminarea meiozei primare, fiecare cromozom este unitate bicromatidică însă, cu centromer unic. Astfel, are loc reducerea la jumătate a numărului de cromozomi, prima diviziune meiotică fiind o diviziune heterotipică, deoarece se trece de la o celulă cu 2n cromozomi la două celule fiice cu n cromozomi, și de la o cantitate 4C de ADN la o cantitate 2C de ADN.

Anafaza primară: reprezintă faza în care se termină migrarea cromozomilor bicromatidici spre polii celulei. Fiecare cromozom apare ca o structură tipică cu două cromatide unite la nivelul centomerului, care nu s-a divizat. Anafaza I determină astfel separarea din bivalent a celor două cromatide de origine maternă, care se deplasează spre un pol, de celelalte două cromatide de origine paternă, care se deplasează spre celalalt pol. Acest fenomen a fost denumit prereducerea cromatică, deoarece nucleii fii moștenesc un număr haploid (n) de cromozomi.

Telofaza primară: este faza în care cromozomii în număr haploid (n), ajung la poli și se regrupează în noii nuclei fii. La fiecare pol ajunge o jumătate din numărul inițial de cromozomi, Prima diviziune meiotică este, din aceasta cauză, reductională. Dar, deoarece cromozomii sunt încă bicromatidici, cantitatea de ADN corespunde unei celule diploide, fiind 2C. În telofaza I cromozomii suferă modificări caracteristice telofazei mitotice: se despiralizează, se decontractează, rămânând fie sub forma unor structuri filiforme, fie că își pierd individualitatea. La fiecare pol, în jurul cromozomilor se reorganizează nucleul telofazic, cu membrana nucleară și nucleoli, cu formarea celor două celule fiice, respectiv, a celor două spermatocite secundare sau a ovocitei secundare și a primului globul polar.

Spermatocitele secundare, ovocita secundară și primul globul polar intră în cea de a doua diviziune meiotică, meioza secundară, care este, de fapt, un tip special de mitoză, rezultând în final, din fiecare spermatocită secundară câte două spermatide, iar din ovocita secundară ovulul si un globul polar de ordinul II.

Momentul cu importanță genetică îl constituie metafaza secundară, când, imediat dupa realizarea plăcii ecuatoriale, se produce clivarea centromerului fiecărui cromozom bicromatidic, cromatidele surori devenind cromozomi de sine stătători, migrând fiecare apoi către unul din cei doi poli ai celulei. Ca urmare, spermatidele și ovulul vor conține câte un set haploid de cromozomi monocromatidici, ca de altfel și cei trei globuli polari de ordinul II.

Considerând numărul de cromozomi prima diviziune a procesului meiotic este o diviziune heterotipică, deoarece, se pornește de la celule diploide (2n)și se ajunge la celule halploide (n). Cea de a doua diviziune a procesului meiotic este o diviziune homotipică pentru ca se pornește de la celule haploide (n) și se ajunge tot la celule haploide (n).

Din cele prezentate rezultă că, la masculi, din fiecare spermatocită primară se formează patru spermatide care vor deveni, prin spermiogeneză patru spermatozoizi funcționali, în timp ce, la femele acest proces duce la formarea, dintr-o ovocită primară, numai a unei singure celule sexuate, aptă pentru fecundare — ovulul și trei globuli polari, care rareori pot fi și ei fecundați. De regulă, ovocita secundară își oprește evoluția în Metafaza I sau Anafaza I , ramânând în acest stadiu la nivelul

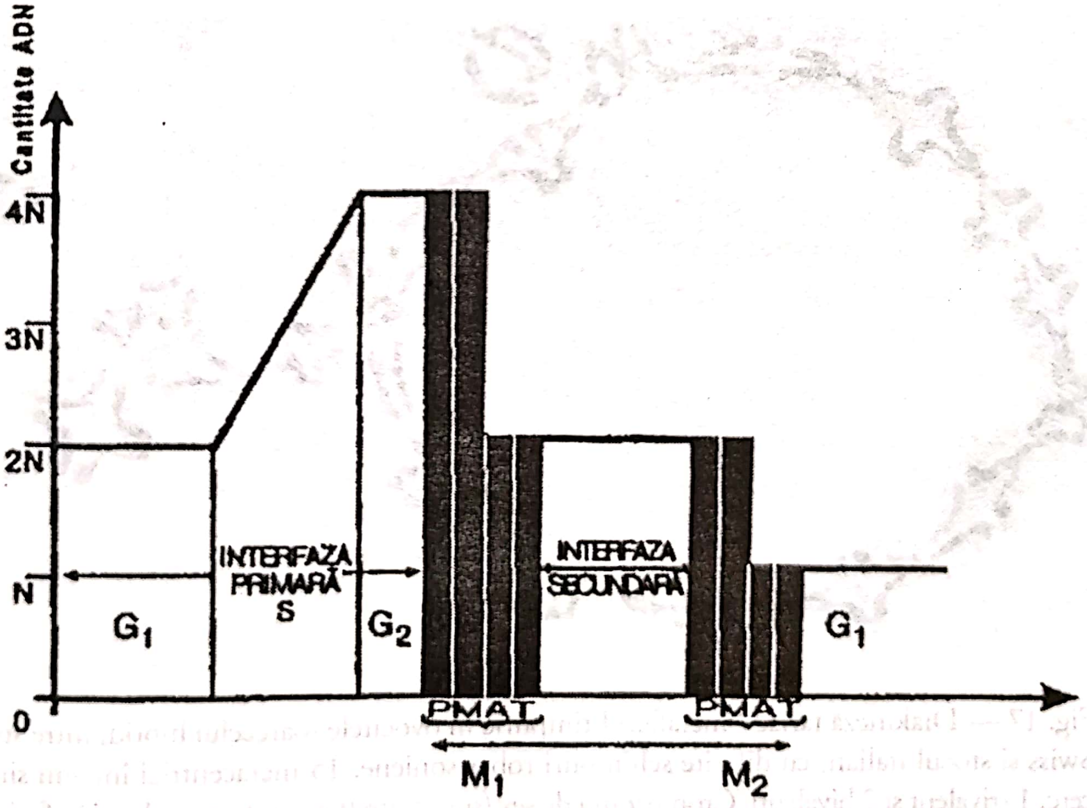


Fig.16 Variația cantității de ADN în raport cu fazele ciclului celular în gametogeneză (din Alberts și colab. 1989).

trompei uterine, până la fecundare. După fecundare meioza se continuă desăvârșindu-se, formându-se ovulul și eliminându-se un corpuscul polar de ordinul II. Dacă fecundația nu are loc, ovocita este direcționată spre apoptoză, autolizându-se.

Semnificația biologică-genetică a meiozeiimplică următoarele:

- reduce la jumătate numărul de cromozomi în gameți, împiedicând în acest fel dublarea numărului de cromozomi în fiecare generație. Ea compensează fecundația. Dacă, în procesul de fecundație ar participa celule cu număr neredus de cromozomi, cu fiecare generație ar avea loc o mărire a numărului de cromozomi, incompatibilă cu existența normală a speciilor.

- asigură recombinarea genetică prin crossing-over, contribuind la variabilitatea organismelor din aceeași specie.

Orice dereglare a desfășurării meiozei are consecințe genetice nefaste (fig.17).

Condițiile meiozei sunt următoarele:

- prezența complexului sinaptonemal;
- posibila împerechere premeiotică a cromozomilor;
- sinapsa propriu-zisă a omologilor;

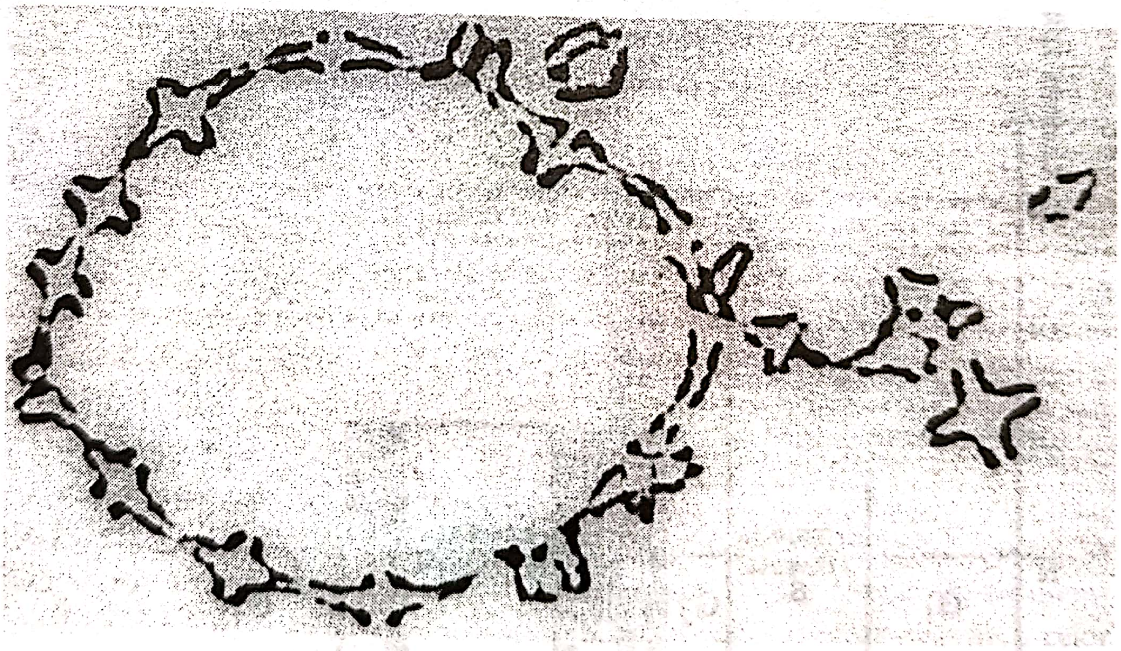


Fig. 17 — Diakineză târzie / metafaza I timpurie în ovocitele șoarecelui hibrid, între stocul Swiss și stocul italian, cu diferite schimburi robertsoniene. 15 metacentrici într-un singur cerc, 1 trivalent și 2 bivalenți. Cromozomii de sex (sus, central) nu au fost implicați în fuziunea centrică în nici unul din stocurile studiate, cromozomii X formând un bivalent normal (din E. Capanna, A Gropp, H. Winking, G. Noak și M. W. Civitelli, 1976)

- cross-overul sau schimbul reciproc de gene între cromozomii omologi, prin rupere de cromatide și reunire de segmente cromatidice omoloage, cu schimb de segmente cromozomale și realizarea recombinării genetice intracromozomale în profaza meiotică; crossing-overul determină trecerea genelor din poziția CIS (AB/ab) în poziția TRANS (Ab/aB) și viceversa.
- disjuncția independentă a perechilor de cromozomi (recombinarea genetică intercromozomală), realizată la trecerea de la metafaza la anafaza primei diviziuni meiotice;
- posibila inexistență a stadiului G_2, deoarece sinteza replicativă a ADN se extinde până în zigoten-pachiten, când se sintetizează ADN-zyg;
- reducerea la jumătate a numărului de cromozomi și a cantității de ADN de la nivel diploid la nivel haploid, cu formarea a patru produși meiotici.

CAPITOLUL III

ELEMENTE DE COMANDĂ ȘI DE CONTROL ÎN ASIGURAREA INTEGRALITĂȚII CROMOZOMULUI EUCARIOT

1. GENERALITĂȚI

Într-o lucrare celebră a lui Lima-de-Faria, apărută în editura „Elsevier", din Olanda, în anul 1983, și intitulată *„Molecular Evolution and Organization of the Chromosomes*", autorul prezintă o imagine nouă asupra cromozomului eucariot, în care acesta nu apare pur și simplu ca un depozitar și transmițător inert al duplexului ADN, adică al genelor, de la o generație la alta, ci ca un sofisticat complex molecular, în cadrul căruia elementele componente acționează, comunică, se sincronizează și se influențează reciproc, în îndeplinirea funcțiilor lor specifice. Autorul vorbește de existența unui câmp cromozomal, comparabil cu câmpul magnetic al Pământului, în cadrul căruia se diferențiază elemente structurale cu funcții distincte, intercorelate. Acest câmp cromozomal are drept poli CENTROMERUL și TELOMERELE. Duplexul ADN se întinde de la un capăt (telomeră) la celălalt capăt (telomeră) al cromozomului, trecând, evident, prin centromer. Genele — segmente ale acestui duplex ADN — deținătoare de informație ereditară pentru sinteza catenelor polipeptidice distincte — ocupă anumite poziții, în cadrul acestui câmp cromozomal, spre telomere (teloni), la mijlocul distanței dintre centromer și telomere (medoni) sau în vecinătatea centromerului (centroni). Un veritabil influx informațional circulă dinspre centromer ("creierul" cromozomului) spre telomere (paznicii integrității structurale a cromozomului) și acesta dictează intrarea în funcție sau ieșirea din activitate a genelor.

Oricât de antropomorfică ar fi o asemenea prezentare a cromozomului eucariot, ea are numeroase puncte de sprijin experimentale. În plus, Lima-de-Faria (1983) ne prezintă un punct de vedere provocator, privind evoluția cromozomului eucariot. El pornește de la ideea originii acestuia din cromozomul unic al procariotelor, în urma unor duplicații și concatemerizări succesive, urmate de diversificarea și specializarea acestor elemente, inițial redundante. Un asemenea concept are la bază identificarea în cromozomul procariot a elementelor structurale esențiale ale cromozomului eucariot (în speță centromerul și telomerele, sub forma unor structuri precursoare — precentromer, pretelomere) reprezentate de secvențe specifice de nucleotide. Asemenea structuri precursoare s-au complexificat, în decursul evoluției sistemelor biologice, prin redundanță informațională și diversificare, paralel cu asocierea lor cu alte elemente moleculare de tip semantide (proteine specifice și ARN), devenind structuri suis-generis ale cromozomului eucariot, esențiale în structura și funcția acestuia.

Astfel, structurile esențiale ale cromozomului procariot, precum originea replicării (*ori C*), repetițiile terminale, secvențele palindromice (cu bisimetrie rotatorie), etc, își au corespondenții lor sub o formă mult mai sofisticată și uneori multiplicată, în diferitele elemente structurale și funcționale ale cromozomului eucariot.

În opinia lui Lima-de-Faria (1983), originea replicării din repliconii procariotelor este un protocentromer, iar terminalul replicării acestuia, o prototelomeră.

Asemenea imagine în dinamica sa evolutivă asupra cromozomului eucariot înlătură ideea că acesta ar fi o structură rigidă, oferind posibilitatea identificării numeroaselor fațete ale unei asemenea structuri vitale în asigurarea continuității și evoluției vieții pe Terra.

În cele ce urmează vom prezenta aspectele moderne, privind elementele structurale definitorii ale cromozomului eucariot.

2. CENTROMERUL

Termenul de centromer derivă de la cuvintele grecești KENTRON=centru și MEROS=parte. Centromerul (plural centromeri) reprezintă o secvență bine definită a duplexului ADN, din cromozomul eucariot, de la nivelul *constricției primare* a acestuia. Adesea se face confuzie între centromer și constricția primară, confuzie inadmisibilă pentru nivelul actual de cunoaștere, întrucât centromerul reprezintă o secvență din cadrul unicului duplex ADN al comozomului, duplex care se întinde de la o telomeră la cealaltă telomeră, trecând și la nivelul constricției primare, pe când constricția primară este un element de morfologie cromozomală (o formă, nu un conținut!) reprezentând o gâtuire, o strictură a cromozomului, dispusă spre un capăt/ sub capătul, în regiunea mediană sau chiar în punctul median al cromozomului. Asemenea poziție a acestei constricții primare reprezintă baza clasificării morfologice a cromozomilor eucariotici în acrocentrici telocentrici, subtelocentrici, submetacentrici și metacentrici. După opinia noastră, termenul de centromer este nepotrivit, dacă se iau în considerație doar valențele sale topologice și structural/morfologice, întrucât el acoperă doar cazul cromozomilor metacentrici, în care, într-adevăr, o asemenea structură se află la mijlocul (în centrul) cromatidei, împărțind-o pe aceasta în două brațe egale. Dar în cromozomii submetacentrici, subtelocentrici și acrocentrici, centromerul nu se mai află „la mijloc". Dacă însă se iau în considerație valențele funcționale ale centromerului, atunci termenul este adecvat, în sensul că el reprezintă situsul cromozomal cu valoare de centru de comanndă al dinamicii cromozomale, intim asociat kinetocorului — structură pluristratificată la care se atașează fibrele fusului de diviziune. Printr-o asemenea asociere directă centromer-kinetocor, centromerul devine centrul mișcării cromozomului spre polii fusului de diviziune, în cursul diviziunii celulare, indiferent de morfologia sa.

Secvența de nucleotide a centromerului cuprinde diferite tipuri de ADN satelit. Repetițiile satelitice alfoide au aproximativ 170 de perechi de nucleotide și la nivel cromozomal se asociază heterocromatinei constitutive, pericentromerice. În cazul cromozomilor umani, limitele de variație ale acestui ADN satelitic alfoid sunt între 5 și 140 perechi de nucleotide. Centromerul mai conține și alte secvențe satelitice, desemnate *sateliții beta*, reprezentați de repetiții de 68 perechi de nucleotide, precum și sateliți cu repetiții între 5 și 48 perechi de nucleotide.

Secvența centromerică a ADN cromozomal cuprinde frecvent și o repetiție comună de tip *GGAAT*, precum și repetiția *AT*.

La drojdia *Schizosaccharomyces pombe* s-au descris mai multe secvențe centromerice, desemnate *Cen1*, *Cen2* și *Cen3*. *Cen3* este ceva mai lungă față de celelalte două și prezintă totodată unele diferențe în secvența motiv repetitivă (secvența consens). Secvența repetitivă din Cen3 are aproximativ 110 Kb și prezintă o unitate centrală de 15-20 Kb precum și regiuni flancatoare de 30 și respectiv de 60 Kb. Structura moleculară a centromerului drojdiilor este redată în figura 1.

O parte importantă a centromerului este reprezentată de proteinele asociate secvenței centromerice care sunt denumite proteine CENP. Proteina CENP-B se leagă la o secvență motiv centromerică, alcătuită din 17 perechi de nucleotide. Acest motiv este 5'- CTTCGTTGGAAACGGGA-3'. CENP-A are 17 Kda, CENP-B are 80Kda, CENP-C are 140 Kda, iar CENP-D are 50 Kda. Faptul că CENP-C nu a fost identificată a fi asociată cu centromerul inactiv al unui cromozom dicentric a generat ideea că asemenea proteină centrică este esențială în funcționarea centromerului. Ea a fost identificată în placa kinetocorului, fiind o parte componentă a acestei structuri. Pe de altă parte, CENP-B se află atât la nivelul centromerului activ, cât și la nivelul centromerului inactiv al unui cromozom dicentric, ceea ce arată că această proteină centromerică se află asociată în proporție de 99% cu secvența centromerică și numai în proporție de 1% cu kinetocorul.

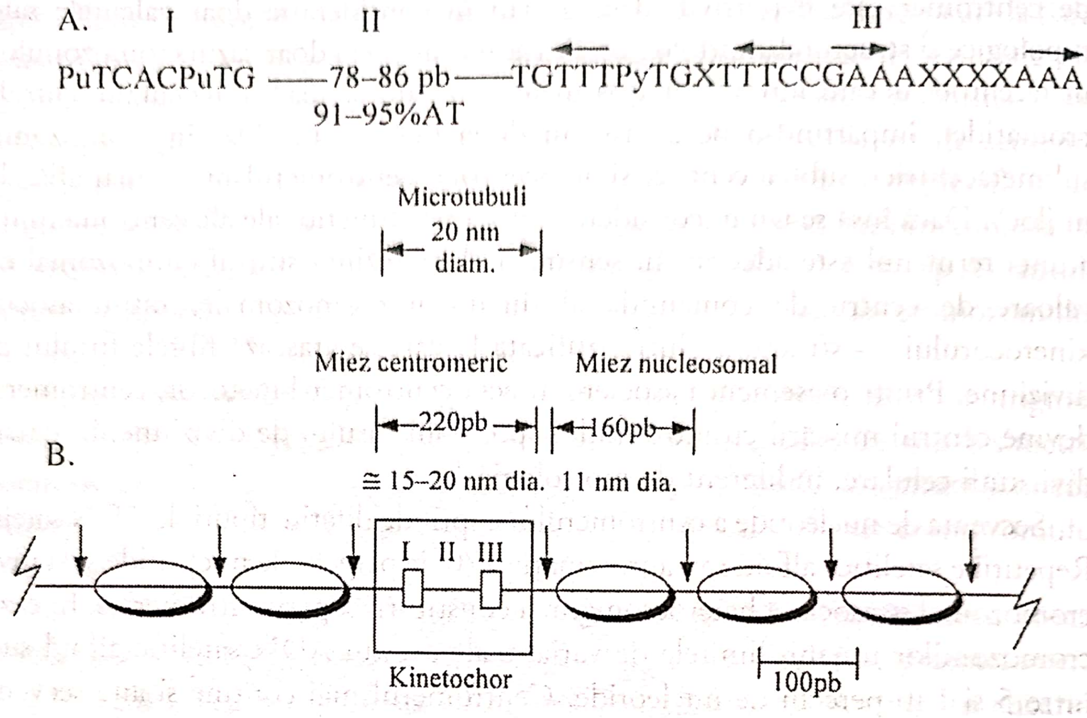

A.
I
II
III
PuTCACPuTG ——78–86 pb——TGTTTPyTGXTTTCCGAAAXXXXAAA
91–95%AT
B.
Microtubuli
20 nm diam.
Miez centromeric
Miez nucleosomal
220pb
160pb
≅ 15–20 nm dia.
11 nm dia.
I II III
Kinetochor
100pb

Fig. 1 — Structura moleculară a centromerului drojdiilor
A. Secvența consens pentru trei regiuni (I-III) ale centromerului la zece specii de drojdii: Pu = purină; Py = pirimidină, X= orice bază. Săgețile indică secvențele invers repetate. B. Reprezentarea schematică a unei regiuni centromerice la drojdii. Săgețile indică situsurile hipersensibile la nuclează. Un microtubul are aproximativ aceeași lățime ca regiunea centromerică (după Clarke și Gabon, 1985).

CENP-B are două regiuni care sunt acide, deoarece au un conținut bogat în glutamină și aspartamină. Acești aminoacizi pot modifica conformația cromatinei, prin reacție cu alte proteine centromerice.

În cazul cromozomilor dicentrici, rămâne funcțional un singur centromer, cel de al doilea fiind inactivat, ca și când ar dispărea, ceea ce înseamnă că centromerul este o structură dinamică, versatilă, funcție de contextul cromozomal și celular.

Linia celulară L 929 are un cromozom marker cu 8 centromeri proeminenți și doi centromeri minori, dar numai una dintre aceste 10 structuri centromerice vor funcționa ca centromer la care se va atașa kinetocorul. Natura polimorfică a centromerilor este importantă în menținerea integrității cromozomului. Nu există o unitate funcțională minimă sub care funcția centromerului este compromisă. Rupturile cromozomale la nivelul centromerului pot genera cromozomi telocentrici și se numesc fisiuni centrice, de tip Robertsonian. Fuziunea a doi cromozomi acrocentrici (translocație echilibrată) cum ar fi cromozomii umani 14 și 21, generează un cromozom submetacentric.

Cromozomii supranumerari B, de la porumb, prevăzuți cu centromeri normali se transmit de la o generație la alta, pe când cei care nu au centromer sunt repartizați aleatoriu în celulele fiice, adesea pierzându-se din linia de porumb, de-a lungul generațiilor.

Primul centromer studiat în detaliu a fost centromerul cromozomului Y uman. Repetiția alfoidă este esențială, vitală, în funcționarea centromerului. Astfel, s-a dovedit că dacă numai o foarte mică parte a brațului scurt al cromozomului Y uman, de numai 300 Kb se asociază cu 200 Kb de repetiție alfoidă, rezultă o structură centromerică funcțională.

La *Drosophila melanogaster*, s-a dovedit că gena *bobbed* se află în cromozomul Y, dar aceeași genă este localizată și în cromozomul X, în imediata vecinătate a centromerului, la 66,0 centimorgani. Între centromer și această genă, la nivelul cromozomului politen I (X) au mai fost localizate încă cinci gene, unele dintre ele chiar la nivelul secvenței centromerice. Aceste gene sunt: *fin*, *rfr*, *lf*, *sme* și *bord*.

La *Neurospora sp.* ca și la *Zea mays* au fost localizate, de asemenea, gene la nivelul centromerului. De regulă, în cazul cromozomilor dicentrici, doar unul dintre centromeri este activ (de regulă acela care se află situat mai aproape de un pol al fusului de diviziune).

La *Drosophila sp.* genele responsabile pentru controlul activității centromerice a cromozomului X sunt localizate în regiunea heterocromatică a acestui cromozom, adiacentă centromerului.

La porumb și la secară a fost evidențiată o activitate neocentrică (Prakken și Muntzing, 1942, Rhoades, 1952), datorită căreia porțiuni din cromozomi, detașate prin iradiere și care nu cuprind și secvența centromerică, se pot atașa la fibrele fusului de diviziune. Unele proteine centromerice sunt responsabile de menținerea împreunată a centromerilor cromozomului metafazic, în momentul în care are loc contractarea microtubulilor fusoriali și este inițiată separarea cromatidelor surori.

La artropode, numeroase ordine de insecte, unele alge conjugate și plantele din familiile *Juncaceae* și *Cyperaceae*, cromozomii au centromer difuz care nu este strict localizat, astfel că fibrele fusului de diviziune se pot atașa în mai multe situsuri asociate kinetocorilor, de-a lungul cromozomului.

În cazul cromozomilor insectelor și monocotiledonatelor care sunt lipsiți de constricție primară, prezentând un centromer difuz, atașarea kinetocorului are loc pe toată lungimea lor, astfel că, asemenea cromozomi nu mai suferă curbare în cursul mișcării anafazice. Radiațiile care produc fragmentarea unor asemenea cromozomi, generează fragmente centrice care pot fi distribuite în nucleii-fii.

La muntiacul chinezesc (*Muntiacus muntjak reevesi*, 2n=46) cromozomii sunt mai mici și telocentrici. Această specie nu se poate diferenția fenotipic de muntiacul indian (*Muntiacus muntjak vaginalis*, 2n=6, la femele și 2n=7, la masculi) cu care în captivitate poate realiza și încrucișare, cu formare de hibrizi. Cei șase, respectiv șapte, cromozomi, de la *Muntiacus muntjak vaginalis* sunt de dimensiune foarte mare. Bandarea G a evidențiat corespondența dintre benzile G ale fiecăruia dintre acești cromozomi cu mai mulți cromozomi ai speciei *Muntiacus muntjak reevesi*, de unde s-a dedus că evoluția acestor două specii dintr-o formă ancestrală comună s-a realizat fie prin fuziune de cromozomi (în cazul în care forma ancestrală a avut 2n=46 cromozomi), fie prin fisiune centromerică (în cazul în care forma ancestrală a avut 2n= 6,7). Prin translocarea unui autozom pe un cromozom X, a rezultat forma heterozomală a masculului, cu heterozomi multipli. Cromozomul X are un centromer masiv și un kinetocor asociat foarte evident, reprezentând 1/3 din lungimea acestui cromozom.

La viermele *Parascaris equorum*, s-au descris cromozomi policentrici, în linia germinală existând doi asemenea cromozomi, alcătuiți prin fuziune cap-la-cap a 52-72 cromozomi monocentrici, fiecare având câte un centromer al său.

3. CINETOCORUL (KINETHOCOR)

Asociat centromerului este cinetocorul sau kinetochorul (de la cuvintele grecești: *kynein*=mișcare și *chorein*=a purta), reprezentând o structură de natură proteinică intim asociată (apoziționată) secvenței centromerice, la nivelul constricției primare. Pentru ficare centromer există doi cinetocori, unul, de o parte, celălalt, de cealaltă parte a centromerului cromozomului metafazic, bicromatidic. Cinetocorul apare ca o placă laminară pauci – sau multistratificată atașată cromozomului metafazic (fig 2). Microtubulii sunt atașați la cinetocor, având o orientare clar polarizată. Cea mai evidentă structură a kinetochorului o prezintă alga verde-filamentoasă *Oedogonium*.

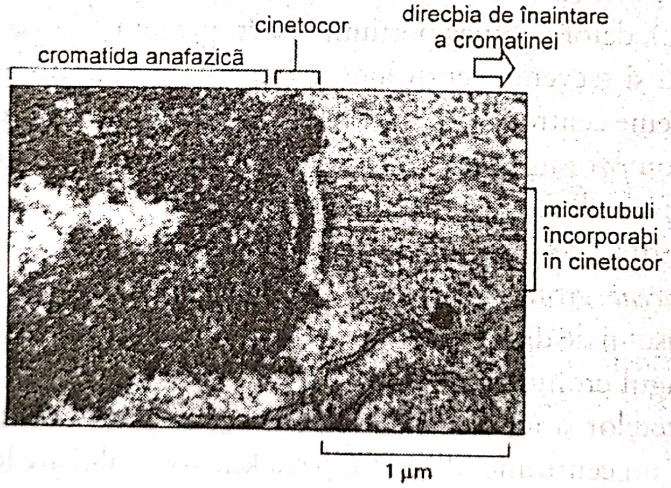

cinetocor
direcþia de înaintare a cromatinei
cromatida anafazică
microtubuli încorporaþi în cinetocor
1 µm

Fig. 2A — Imaginea electronomicroscopică a unei cromatide anafazice (cromozom-fiu) de la alga verde filamentoasă Oedogonium, cu microtubulii atașați la cinetocorul său (după J.D. Pickett-Heaps și L.C. Fowke, 1970)

Fiecare cinetocor are un element intern de 400-600 Å aflat în nemijlocită asociere cu centromerul, unul median, de 250-300 Å, ți unul extern, de 400-600 Å, la acesta din urmă atașându-se fibrele fusului de diviziune, în număr de 16-40.

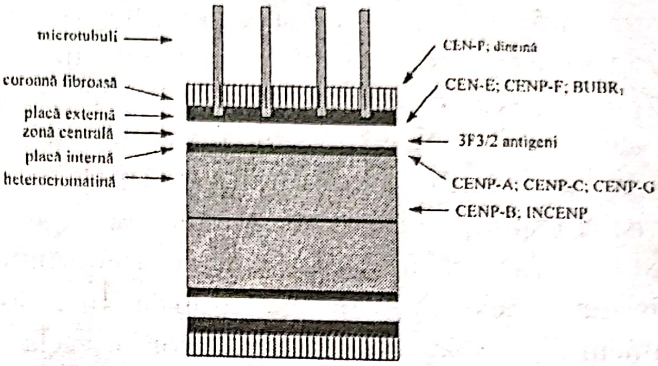


Fig. 2B — Reprezentarea schematică a structurii fine a cinetocorului cu precizarea unora dintre proteinele centromerice asociate acestuia (după Hulten și Tease. Encyclopedia of Genetics. Academic Press, 2001)

Proteinele CENP sunt asociate centromerului și sunt de mai multe tipuri, desemnate A-E. Proteina CENP-B de 80 Kda conferă funcționalitate cinetocorului fiind asociată centromerului și, având două regiuni acide, foarte bogate în glutamină și aspartamină. Ea poate altera conformația cromatinei, prin interferență cu alte proteine prezente la nivelul centromerului. Proteina 2 (MAD2) monitorizează legarea microtubulilor la cinetocor, prin fosforilare și defosforilare. Cinetocorii pot fi colorați și, deci, identificați, prin utilizarea unei tehnici de colorare argentică numită *bandare Cd*.

Cea mai sigură metodă de identificarea a cinetocorilor este metoda imunofluorescentă de utilizarea serului CREST, provenit de la suferinzii de sclerodermа (boală autoimună) și care conține anticorpi anticinetocor. Remarcabila rezistență a centromerilor metafazici la hidroliză cu enzime proteolitice, soluții hipotone, agenți chelatori și soluții alcaline puternice pare a fi legată de asocierea acestora cu cinetocorii.

Cu vârsta se pare că se pierd sau se diminuează benzile Cd. În absența cinetocorului, cromozomul devine instabil. Astfel, se poate explica pierderea de cromozomi din țesuturile somatice, odată cu înaintarea în vârstă.

În unele cazuri, cinetocorul rămâne structurat și în timpul Interfazei, intrând ca parte componentă a *scaffold*-ului cromozomal (Earnshaw și colab., 1984). În Profază începe asamblarea cinetocorului asociat centromerului. În Prometafază fibrele cinetocore se asociază cu cinetocorii fiecărei cromatide-surori. La planta *Haemanthus katherinae*, care are printre cei mai mari cromozomi de la eucariote, în Metafază, la un singur cinetocor se asociază 50-100 microtubuli (fibre) cinetocorici. La mamifere, la fiecare cromatidă se atașează 10-20 asemenea microtubuli.

În Anafază, filamentele cinetocore ale fiecărei cromatide surori sunt întinse spre polii fusului, în direcția de mișcare a fiecăreia dintre ele.

În Mitoză, cinetocorii-fii ai cromozomului se atașează la microtubulii fusului, astfel încât să fie orientați spre polii opuși ai acestuia, făcând posibilă separarea cromatidelor-surori, ale fiecărui cromozom spre polii opuși ai celulei aflată în diviziune, ceea ce asigură ca fiecare celulă-fiică să primească un complement cromozomal complet. În prima diviziune meiotică însă, cinetocorii-fii ai unui cromozom sunt orientați spre același pol, pe când cei ai omologului său sunt orientați spre polul opus, asigurându-se segregarea cromozomilor omologi, cu reducerea la jumătate a numărului de cromozomi, în celulele-fiice, făcând ca prima diviziune meiotică să fie reducțională. În a doua diviziune meiotică, comportamentul cinecorilor este asemănător cu acela din mitoză, asigurând segregarea cromatidelor-surori, cu păstrarea aceluiași număr de cromozomi.

În Telofază, cinetocorul este dezorganizat, prin dezintegrarea mai întâi a stratului extern, apoi a celui intern.

4. CONSTRICȚII SECUNDARE

În morfologia unora dintre cromozomii eucariotici, pe lângă constricția primară (cp), la nivelul căreia se află secvența centromerică, s-a mai descris existența unei a doua stricturi sau gâtuituri, care a fost *denumită constricție secundară* (CS). Funcția primară a constricției secundare este aceea de a adăposti genele sau cistronii ribozomali, din care cauză constricția secundară este asociată *regiunii organizator nucleolare* (NOR), iar cromozomul care poartă o asemenea regiune se numește *cromozom organizator nucleolar*, asemenea cromozomi sunt întâlniți în toate celulele nucleate, de la mezocariote la mamifere.

Analiza electronomicroscopică a cromozomilor politeni la diptere precum **Chironomus, Mycetophila, Rhagoletis** a permis evidențierea regiunilor organizator nucleolare în cromozomii politeni, la nivelul cărora sunt construiți nucleoli giganți, consecință a amplificării cistronilor ribozomali, în aceste cazuri (fig. 3).

Constricțiile secundare reprezintă situsuri de transcriere întârziată a ARNr la care condensarea cromozomală este incompletă. Ele pot fi evidențiate cu ajutorul unei colorații argentice (Goodpasture și Bloom, 1975).

Elementele de fenotip cromozomal (constricție primară, constricție secundară — regiune organizator nucleolară — sateliții) sunt bine evidențiate în trecerea cromozomului dinspre Profază spre Metafază, adică în Prometafază (fig. 4).

La *Pisum sativum*, regiunile organizator nucleolare au un aranjament diferit, în două perechi de cromozomi și ele prezintă diferențe de dimensiune.

Regiunile NOR sunt stabile în cursul mitozei, dar în meioză, prin crossing-over inegal, ele pot fi diferite ca lungime. Din această cauză, pot apare diferențe în secvența de nucleotide, de la o specie la alta, la nivelul NOR. Polimorfismul NOR este relativ stabil și transmis în manieră mendeliană.

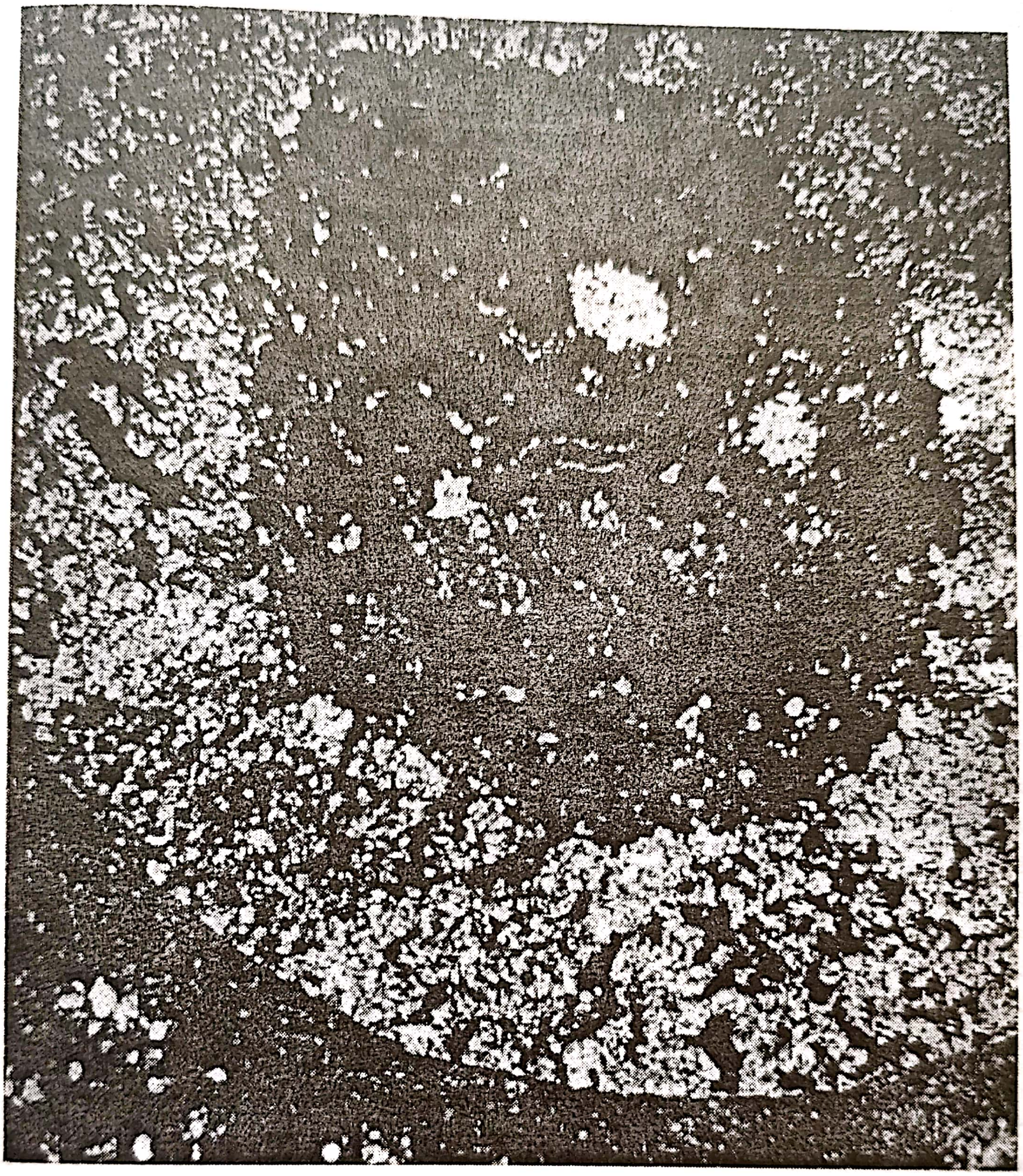


Fig. 3 — Imaginea electronomicroscopică a nucleolilor giganți din nucleii politeni de **Rhagoletis** (A) și **Mycetophila** (B) la a căror realizare contribuie numeroase regiuni organizator nucleolare (amplificare genică ribozomală) Ax110.000; Bx95.000. (original)

La orangutan și șoarece, opt perechi de cromozomi prezintă NOR. La șoarece, NOR-urile sunt apropiate de centromer, rareori având o localizare terminală. La cobai și gorilă, NOR are localizare telomerică.

Cromozomii purtători de NOR s-au mai numit *cromozomi sateliferi*, adică purtători de sateliți. *Satelitul* sau *trabantul*, în nomenclatura cromozomală clasică,

Fig. 3B

reprezintă porțiunea din brațul scurt al cromozomului cu constricție secundară și NOR care se întinde de la constricția secundară la telomeră și care este prinsă de cromozom printr-un dublu filament. În interpretările vechi, această regiune apărea ca fiind lipsită de cromatină, din care cauză s-a mai numit regiunea SAT (de la *sine acido timonucleico* — adică lipsită de acid timonucleic, respectiv de ADN). La unele specii apare o dublă constricție secundară care împarte satelitul într-o porțiune mai mare (macrosatelitul=M) și o porțiune mai mică

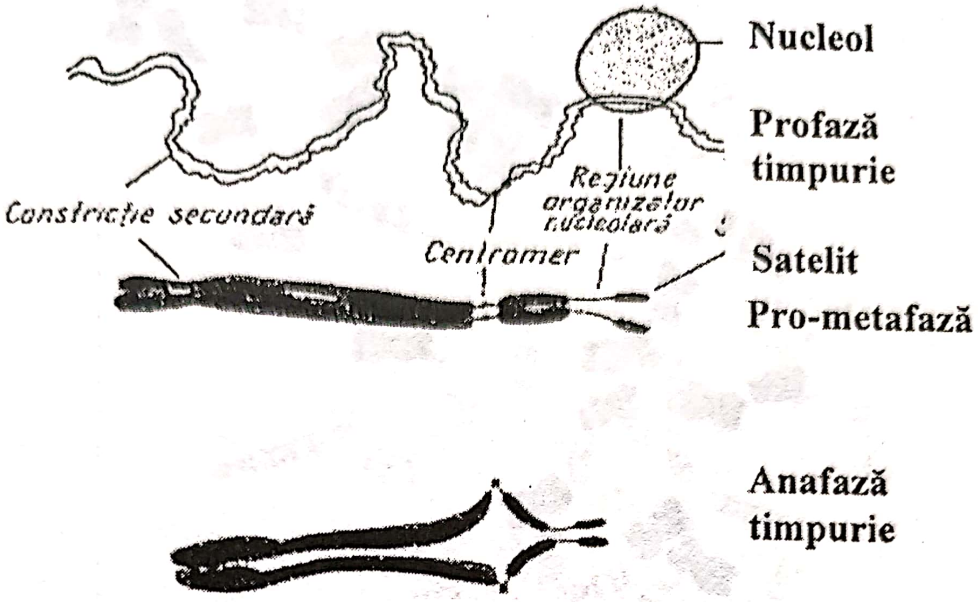


Fig. 4 — Stadii succesive în evoluția unui cromozom din momentul individualizării sale (Profaza timpurie) până în momentul clivării centromerului și al separării cromatidelor surori (sfârșitul Metafazei — începutul Anafazei). Cromatidele-surori (cromozomii-fii) vor prezenta forma de V în cursul migrării lor spre poli (Anafază), deoarece fibrele fusului de diviziune sunt atașate la cinetocorul asociat centromerului aflat în vârful „V"-ului. Se constată condensarea progresivă a cromatidelor (fibrelor nucleohistonice) însoțită de o scurtare și o îngroșare a lor, aceste procese atingând apogeul în Metafază. Constricția secundară în care se află cistronii ribozomali este asociată cu nucleolul, acesta suferind dezorganizare la sfârșitul Profazei. Cealaltă constricție secundară din brațul lung al cromozomului nu este purtătoare de regiune organizator nucleolară (NOR). Desenul redă totodată și poziția sateliților față de regiunea organizator nucleolară, localizată la nivelul constricției secundare, din brațul scurt al cromozomului (din Stebbins, 1971).

(microsatelit=m). Există tehnici speciale de evidențiere a sateliților, dar și cu metodele „clasice", ocazional pot fi evidențiați sateliții, atât la plante cât și la animale și om (fig.5).

Există însă și constricții secundare în care nu se află cistroni ribozomali, din care cauză funcția lor rămâne necunoscută.

În condiții specifice de carențe nutriționale ale unor culturi de celule de mamifere apar așa numitele *situsuri fragile*. Acestea conferă sectorului cromozomal în care ele apar aspectul unei constricții secundare și predispun la împrăștiere mecanică brațul cromozomal respectiv. Prin analogie cu NOR, situsurile fragile sunt regiuni de incompletă condensare cromozomală, probabil tot ca o consecință

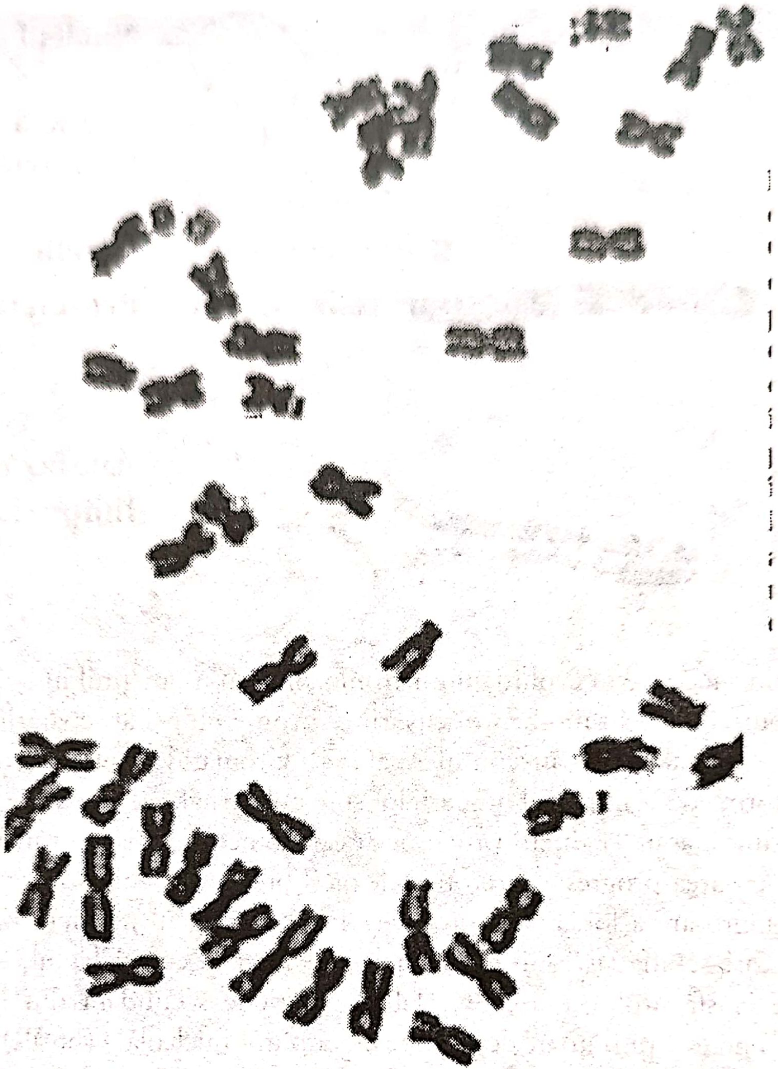


Fig. 5 — Complementul cromozomal de la ardei *Capsicum annuum* (2n = 24) în care apar doi cromozomi purtători de sateliți legați la cromozomi (sus) sau detașați de cromozomi (jos), ca urmare a realizării preparatelor tip squash (strivire între lamă și lamelă). Evidențierea acestor sateliți nu a implicat aplicarea vreunui tratament special (original).

a unui proces de transcriere întârziată, în cadrul căruia fibra de cromatină trebuie să capete configurația despiralizată, decondensată.

În genomul uman există cinci perechi de cromozomi care prezintă constricții secundare ce adăpostesc NOR și anume perechile 13,14,15,21 și 22 (fig. 6). Adesea, se remarcă procesul de atracție centromerică între asemenea cromozomi care își asociază regiunile lor NOR, dispuse terminal, pentru a funcționa sincron în transcrierea cistronilor ribozomali și construirea unui aceluiași nucleol. În situația

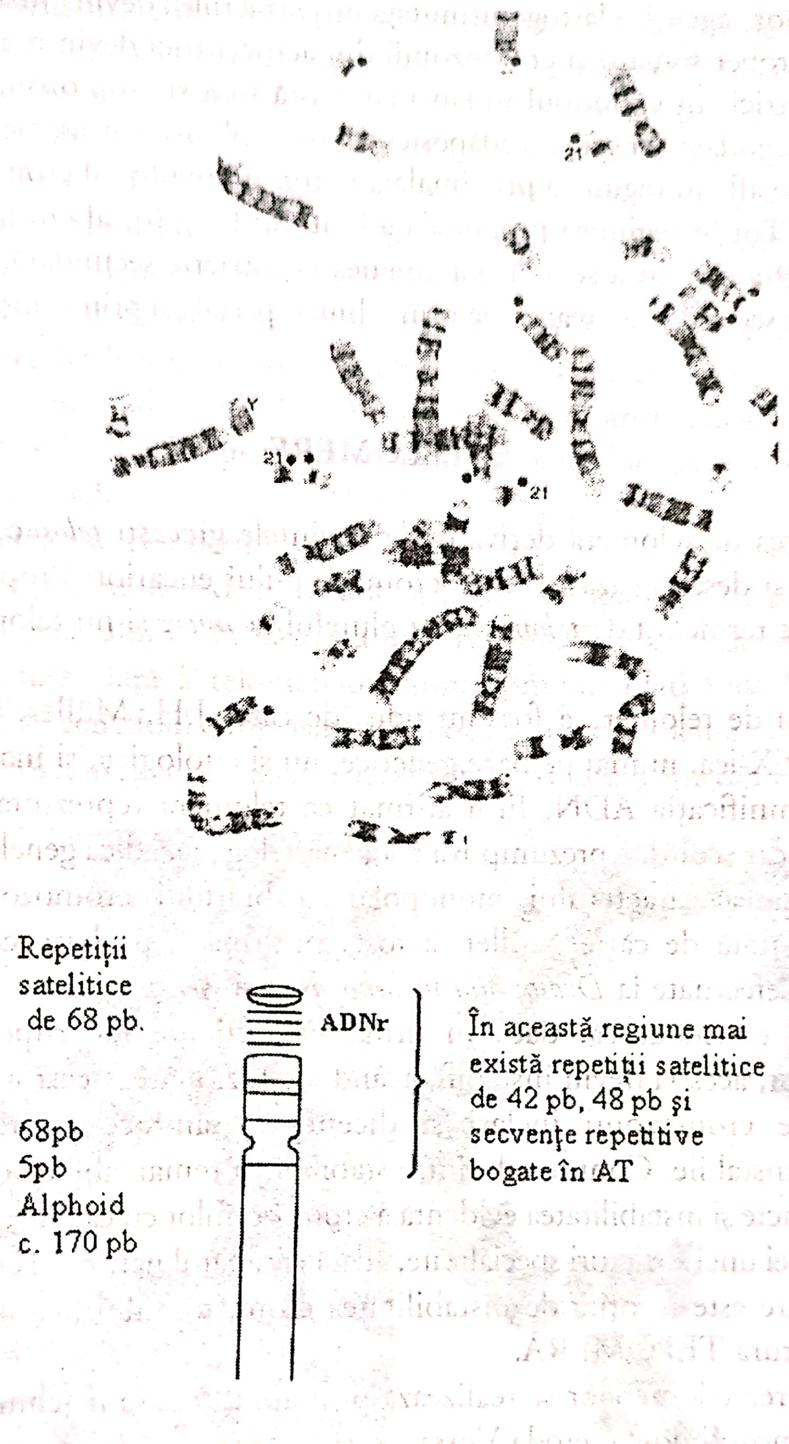

21
21
21
Repetiţii
satelitice
de 68 pb.
ADNr
În această regiune mai
există repetiţii satelitice
de 42 pb, 48 pb şi
secvenţe repetitive
bogate în AT
68pb
5pb
Alphoid
c. 170 pb

Fig. 6 — Cromozomii organizatori nucleolari şi regiunile organizator nucleolare (NOR) la om: a) Cromozomii care prezintă NOR sunt marcaţi cu un punct negru. Ei aparţin perechilor 13, 14, 15, 21 şi 22, astfel că zece cromozomi din complementul diploid uman poartă NOR-uri. În imagine apar 11 asemenea cromozomi, deoarece aceşti cromozomi provin de la o persoană afectată de sindromul Down (trisomia 21) (din Clark şi Wall, 1996). b) Structura regiunii satelifere a unui cromozom 21, redată schematic (din Clark şi Wall, 1996).

acțiunii unor agenți clastogeni/mutageni, atracțiile devin fuziuni centrice (mecanism robertsonian) și cromozomii din acrocentrici devin metacentrici sau submetacentrici. În cariotipul uman mai există însă și cromozomi care conțin constricții secundare dar care nu adăpostesc cistroni ribozomali. asemenea constricții secundare, se află în regiunea proximală a brațului lung (q) al cromozomilor din perechea 1. Tot în regiunea proximală a brațului lung (q) al cromozomilor din perechile a 9-a și a 16-a se află o asemenea constricție secundară. Evidențierea constricțiilor secundare se realizează prin tehnici speciale și prin colorație argentică.

5. TELOMERE

Denumirea de telomeră derivă de la cuvintele grecești *telos*=capăt, sfârșit și *meros*=parte și desemnează capetele cromozomului eucariot. Propunem pentru standardizare termenul de *telomeră*, cu pluralul *telomere* și nu telomer, respectiv telomeri.

Termenul de telomeră a fost introdus de către J.H. Müller, în anii '30 ai secolului al XX-lea, numai pe baze genetice, nu și citologice, și înainte de a se fi cunoscut semnificația ADN. El a afirmat că telomera reprezintă un segment cromozomal care conține prezumptiva telogenă/telogene, adică genele responsabile de determinarea caracterului monopolar la brațului cromozomal. Această ipoteză, enunțată de către Müller, a fost confirmată, pe baza cercetărilor de mutageneză, efectuate la *Drosophila melanogaster* și *Zea mays*.

Müller a constatat că, dacă în urma iradierii are loc ruperea capetelor cromozomilor, aceștia devin instabili, având loc fuzionarea acestor capete rupte, generându-se cromozomi inelari și dicentrici, sau acestea realizează alte configurații instabile. Contrastul dintre stabilitatea remarcabilă a cromozomilor cu capete intacte și instabilitatea evidentă a cromozomilor cu capete rupte a generat ideea existenței unei structuri specializate, aflată la capătul natural al cromozomului, a cărei alterare este însoțită de instabilitatea cromozomului. Müller a denumit această structură TELOMERĂ.

Evidențierea telomerelor se realizează prin aplicarea unor tehnici speciale de tratare a cromozomilor (metoda Vossa, cu colorare Giemsa), în urma cărora este evidențiată heterocromatina asociată telomerelor cromozomilor, rezultând așa numitele benzi T.

Analiza structurii fine a capetelor cromozomilor politeni la **Mycetophila** și **Chironomus** a permis evidențierea unei structuri particulare a telomerelor, în care dispare pattern-ul de benzi, acesta fiind înlocuit cu o buclare a fibrelor de cromatină, buclele având un traiect perpendicular pe axul lung al cromozomului.

O asemenea structură (fig. 7) poate fi comparată cu modelul de încheiere a țesăturilor din in, cânepă sau lână în care în capătul acestora firul se pliază înapoi și se înfige la același nivel cu rândurile transversale ale sale ce preced capătul țesăturii. Este evident un model de arhitectură textilă ce conferă integritate și rezistență țesăturilor, după cum și acest model de arhitectură moleculară a telomerelor cromozomului eucariot este ideal în asigurarea integrității sale structurale.

Actualmente, evidențierea telomerelor este realizată cu ajutorul tehnicii FISH, cu folosirea probelor de ADN telomeric, marcate cu fluorocromi (fig. 8. A, B). Menținerea integrității cromozomilor și a funcției normale a telomerelor sunt vitale pentru evoluția normală a celulei. Adesea, transformarea malignă a celulelor mamiferelor se asociază și cu alterări ale structurii telomerelor, generatoare de diverse aberații cromozomale.

Polarizarea telomerelor permite ca în Profaza târzie, cromozomii să se deplaseze spre o regiune a nucleului unde formează, prin grupare, așa-numitul *buchet*, descris la unele specii, mai ales în Profaza I a meiozei, atât la plante cât și la animale. Există o orientare clară a telomerelor cromozomilor aflați încă în interiorul nucleului, față de centriolii citoplasmatici. Tot telomerele orientează cromozomii fiecărui set haploid, în spermatozoizii coccidelor, într-o dispoziție cap-la-cap, liniară,

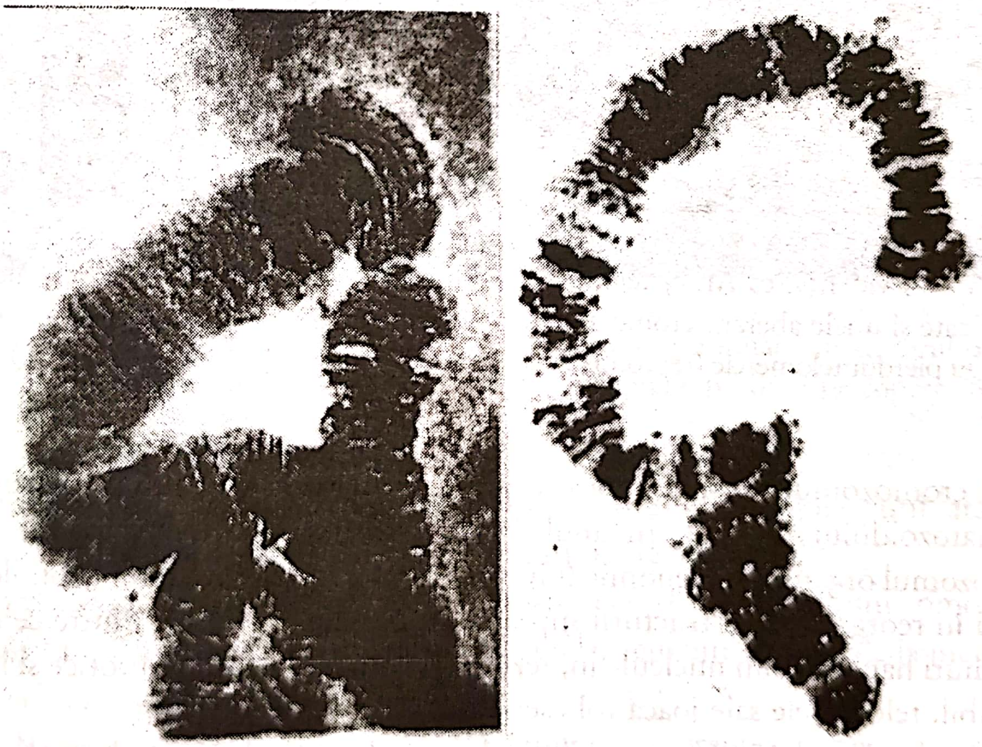


Fig. 7 — Arhitectura fibrei de cromatină la nivelul telomerelor cromozomilor politeni la *Chironomus plumosus* (stânga) și la *Mycetophila agarici* (dreapta). (original).

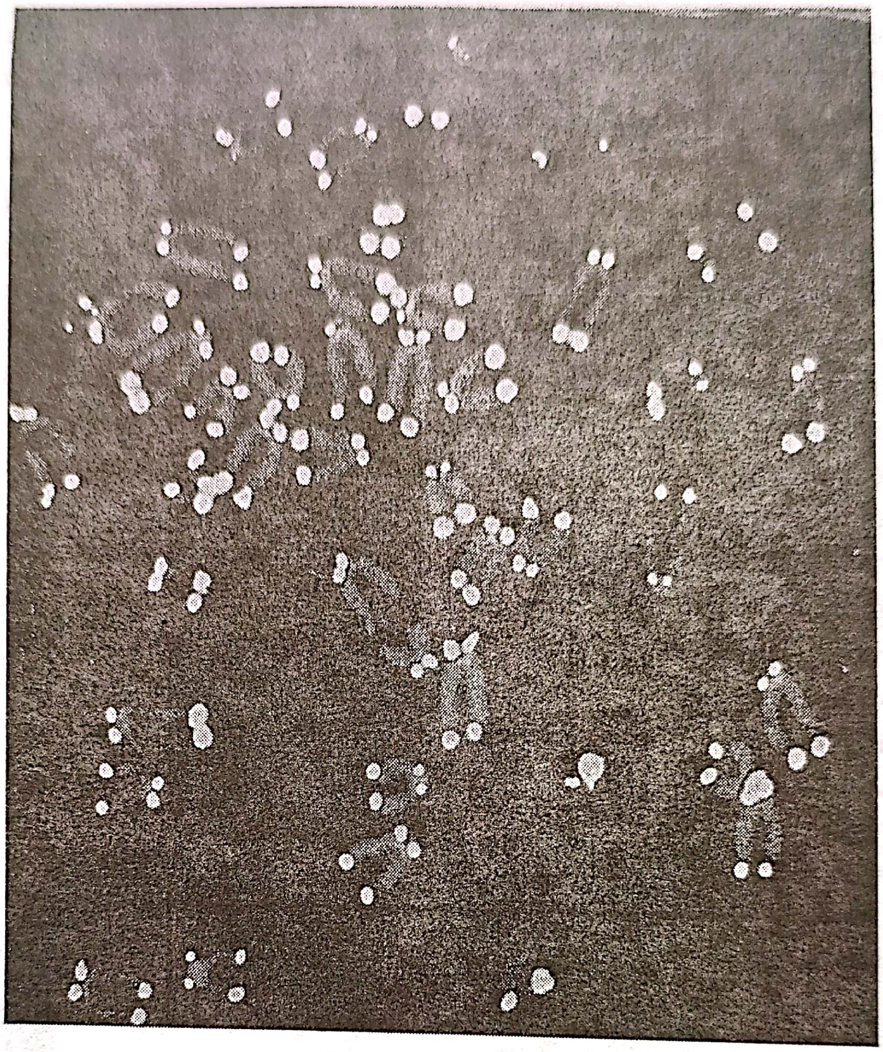


Fig. 8A — Evidențierea ADN telomeric prin marcaj fluorescent. Pe această cale pot fi identificate și unele aberații cromozomale precum fuziunile de capete ale cromozomilor care și-au pierdut telomerele (reprodus după Tong, G., Sagital, J., Mechelson, Z., Q. Wang, 2000).

având cromozomul cel mai lung primul în formație și el conduce pătrunderea spermatozoidului în ovul. În anul 1996, Gavrilă și colaboratorii au descris cromozomul organizator genomic (GOC), cu rol în orientarea cromozomilor spre poli și în reorganizarea structurii supracromozomale a fiecăreia dintre cele două genomuri haploide din nucleul-fiu, rezultat în urma diviziunii mitotice și în care, probabil, telomerele sale joacă rol esențial.

Și la plante, precum *Crepis capillaris*, în cursul pătrunderii tubului polinic prin micropilul ovulului, cromozomii setului haploid sunt așezați telomeră-la-telomeră și această dispoziție a cromozomilor a fost considerată drept dovadă a organizării supercromozomale a genomului eucariot.

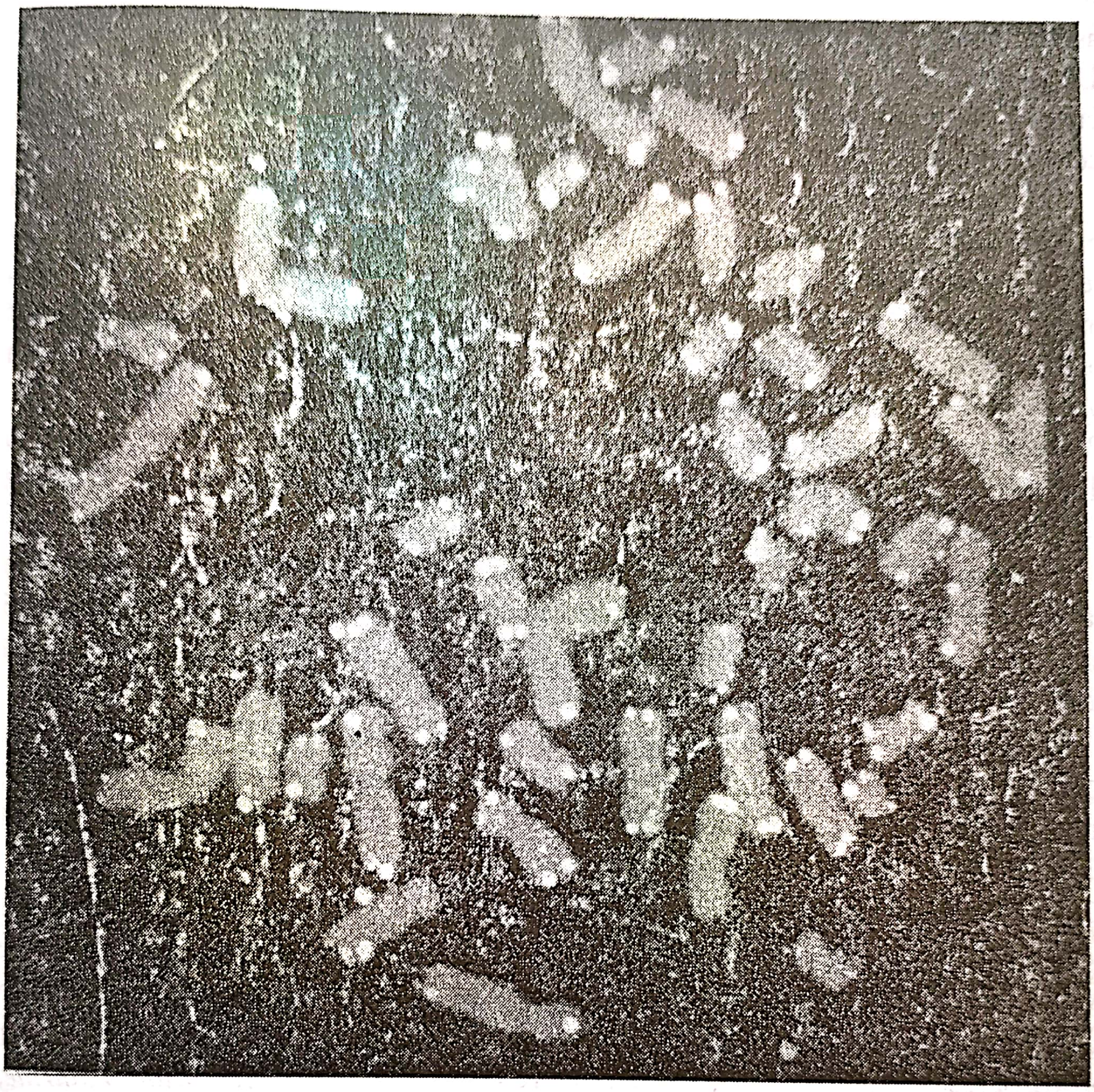


Fig. 8B — Marcajul repetițiilor telomerice în cromozomii umani cu ajutorul probelor marcate fluorescent, pentru asemena repetiții (imagine reprodusă pe coperta *Nature*, vol. 350, 18 aprilie 1991).

În Pachitenul meiozei, telomerele cromozomilor omologi sunt atașate la membrana internă a anvelopei nucleare, în puncte adiacente.

Complexul sinaptonemal format între cei doi cromozomi omologi ai bivalentului meiotic este și el atașat cu capetele elementelor laterale la membrana internă a anvelopei nucleare.

Telomerele sunt alcătuite din ADN telomeric și proteine telomerice. ADN satelit cu localizare telomerică funcționează în reglarea frecvenței și localizării chiasmelor.

La unele specii de plante (*Aegilops, Secale, Bromus, Triticum*) s-a descris atașarea telomerelor la fibrele fusului de diviziune și mobilizarea acestor telomere pe asemenea structuri ale aparatului mitotic, fiind de fapt o activitate neocentromerică. La gramineea *Festuca*, activitatea telomerică este controlată de gene localizate în cromozomii B. Când telomerele manifestă o activitate neocentromerică, centromerii obișnuiți își încetează propria lor activitate.

Telomera cromozomului eucariot are organizare cu regiuni distincte. Există o parte terminală — capătul extrem al cromozomului — puternic colorabilă cu tehnici speciale (bandare T) și care s-a numit *protelomeră* și o parte a telomerei, mai slab colorată, prin utilizarea unor asemenea tehnici, care urmează nemijlocit protelomerei și care s-a numit *eutelomeră.* Cel mai clar model pentru asemenea organizare a telomerelor cromozomului eucariot este întâlnit la *Secale cereale.* Protelomera este alcătuită din trei perechi de cromomere, de mărime variabilă la diferiți cromozomi, precum și din fibrile. Eutelomera este partea cea mai subțire a cromozomului.

Telomera are o structură redundantă, din care cauză, pierderea unei părți din ea, până la un anumit nivel, nu-i alterează iremediabil funcția. Depășirea acestui nivel însă, compromite funcția telomerelor și, prin aceasta, integritatea structurală și funcțională a cromozomului eucariot.

Organizarea moleculară a telomerelor este în totală concordanță cu funcția lor. Secvența ADN telomeric este similară la toate speciile de eucariote analizate, indiferent de locul ocupat de acestea pe scara filogenetică. Totuși, există puțină variație în secvența telomerică, la diferite grupe de organisme.

ADN telomeric constă dintr-o secvență foarte simplă, repetată în tandem. La vertebrate și om, apoi și la mucegaiuri și tripanosome, această secvență este AGGGTT. După cum se vede, în această secvență apare un cluster de resturi de G. La protozoarul *Tetrahymena*, aceasta este GGGGTT (fig. 9), pe când la alt protozoar, și anume *Euplotes*, acesta este GGGGTTTT. La *Plasmodium malariae*, secvența repetitivă este AGGGTT (C/T), la drojdia de bere *Saccharomyces cerevisiae* — G1-3T și la mucegaiul *Dictyostelium discoideum* — G1-3A.

O telomeră este stabilă atâta timp cât întinderea unei asemenea repetiții în tandem cuprinde câteva sute de perechi de nucleotide, la drojdii și ciliate, și mii de perechi de nucleotide, la vertebrate. Deși repetițiile telomerice simple nu se conformează unei secvențe consens specifice, ele au o catenă bogată în G, cu o mare specificitate de orientare în raport cu capătul cromozomului. La fiecare capăt cromozomal, catena ADN telomeric bogată în G, este orientată de la 5' la 3', spre terminalul duplexului ADN și capătul său 3' se prelungește, depășind cu 12-16 nucleotide catena complementară, bogată în C. Bogăția în resturi de G a uneia dintre catenele ADN telomeric implică, în virtutea complementarității, o bogăție de resturi C, în catena complementară, de unde rezultă asimetria moleculară a acestui ADN telomeric și posibilitatea separării sale ca ADN satelit telomeric prin ultracentrifugare izopicnică sau electroforeză. Asociate acestei secvențe telomerice

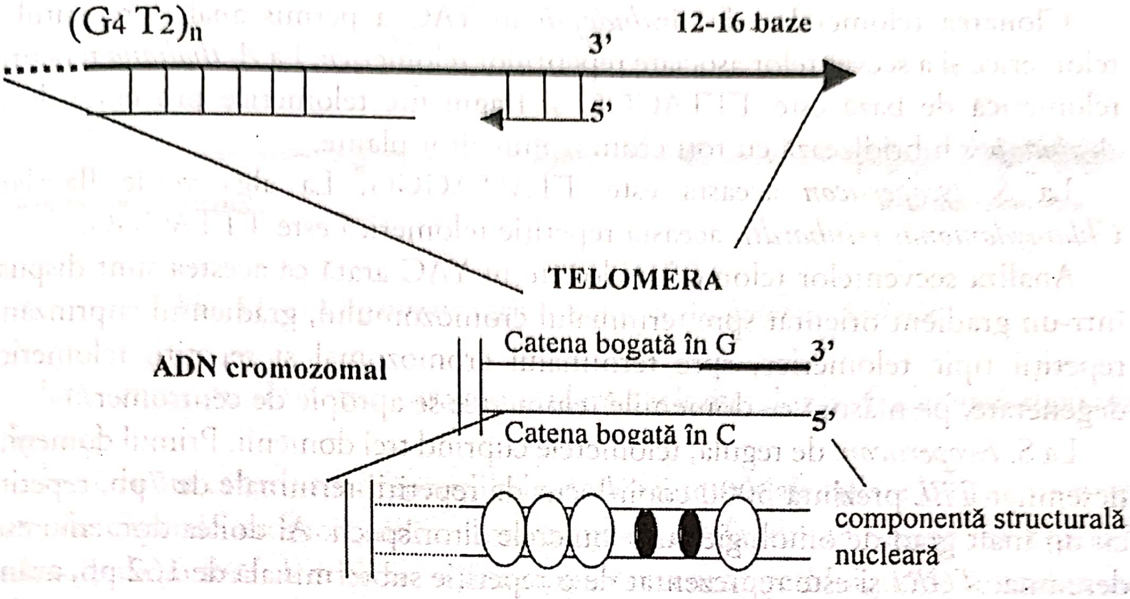


Fig. 9 — Telomerele cromozomului eucariot
Sus – detalii privind structura ADN terminal pentru telomera de la *Tetrahymena.* Rupturi monocatenare pe catena bogată în C apar în partea distală a duplexului telomeric ADN și catena bogată în G (linia groasă) formează o pătrundere terminală ADN.
În centru – orientarea catenelor ADN telomerice una bogată în G, cealaltă, bogată în C.
Jos – Proteinele telomerice și relația lor posibilă cu alte componente structurale proteinice nucleare. Proteina telomerică terminal legată (ovalul deschis) cu o asociere nespecifică cu o structură nucleară precum este anvelopa nucleară poate fi distinctă de proteina de legare neterminală telomerică cum este RAP1, de la drojdia de bere (ovalele hașurate). Complexul ADN telomeric-proteină este mărginit de nucleosomi (cercuri deschise).

se află și alte secvențe numite, ca atare, *secvențe asociate telomerei*. Asemenea secvențe, asociate secvenței telomerice, au fost desemnate *Tas* (de la *telomere-associated sequence*) și la toate speciile studiate, ele prezintă o mare diversitate de succesiune de nucleotide, lungime și complexități. Nu se cunoaște semnificația funcțională sau evolutivă a unor asemenea secvențe asociate secvenței telomerice, dar ele nu par a fi esențiale în funcționarea telomerelor.

Lungimea domeniului de repetiție telomerică este de 28-35 de perechi de baze (pb), la protozoarele ciliate, 100-500 pb, la drojdii, 2-20 kpb (mii de perechi de baze), la cele mai multe dintre vertebratele analizate, peste 100kpb, la șoarece, pe când la plante, aceasta are 3,5kpb, la *Arabidopsis thaliana*, 30-60 kpb, la *Solanum lycopersicon* (*Lycopersicon aesculentum*), și 13-25kpb, la *Soya hispida.* Variații ale lungimii secvențelor telomerice apar nu numai de la o specie la alta, dar chiar și între indivizii aceleiași specii și mai mult încă, între diferiți cromozomi ai aceluiași complement cromozomal al unui individ.

Clonarea telomerelor de *Arabidopsis* în YAC a permis analiza repetițiilor telomerice și a secvențelor asociate repetițiilor telomerice. La *A. thaliana* repetiția telomerică de bază este TTTAGGG și fragmente telomerice provenite de la *Arabidopsis* hibridizează cu toți cromozomii altor plante.

La *S. lycopersicon* aceasta este TTA/TAGGG. La alga verde flagelată *Chlamydomonas reinhardti*, această repetiție telomerică este TTTAGGG.

Analiza secvențelor telomerice clonate în YAC arată că acestea sunt dispuse într-un gradient orientat spre terminalul cromozomului, gradientul cuprinzând repetiții tipic telomerice, spre terminalul cromozomal și repetiții telomerice degenerate, pe măsură ce domeniile telomerice se apropie de centromer.

La S. *lycopersicon*, de regulă, telomerele cuprind trei domenii. Primul domeniu, desemnat *TEL* prezintă 3000 copii/locus de repetiții terminale de 7pb, repetiții cu un înalt grad de omologie cu telomerele altor specii. Al doilea domeniu este desemnat *TGR1* și este reprezentat de o repetiție subterminală de 162 pb, având 500-1000 copii/locus și care este specifică tomatelor (fig. 10) și altor specii înrudite cu acestea.

Al treilea domeniu este o regiune spațiatoare, a cărei structură este încă necunoscută, dar care separă cele două domenii *TEL* și *TGR1*, având de la câteva kiloperechi de baze, până la sute de kiloperechi de baze. Secvențele TAS sunt moderat repetitive și relativ lungi de câteva perechi de baze, conservatorismul lor fiind relativ redus, ele prezentând unele asemănări ca structură și comportament cu elementele genetice mobile. TAS conțin secvențe scurte, omoloage secvențelor telomerice corespunzătoare, unele repetiții telomerice interpuse printre secvențele asociate telomerelor putând fi inversate sau repetate în tandem.

Există și unele *repetiții subtelomerice*, adică blocuri de 100 până la 1000 de repetiții scurte (sub 500pb), dispuse în tandem. Aceste repetiții constituie substratul molecular al heterocromatinei telomerice care a putut fi evidențiat prin tehnica bandării T (benzi telomerice). La *Secale cereale*, o asemenea repetiție aparține familiei cu 480 pb, aceasta reprezentând lungimea repetiției. La *Allium cepa*, repetiția subtelomerică este desemnată PAC8009 și are o lungime a repetiției de 375 pb. La *S. lycopersicon* s-a descris repetiția TGR1, care are o lungime de 162 pb, iar la *Oryza sativa* repetiția a fost desemnată Os48 și are o lungime de 355pb.

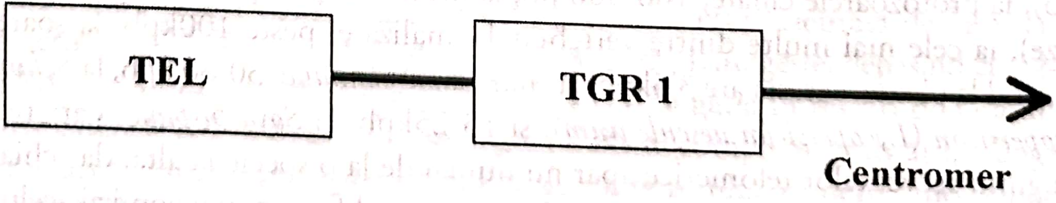


Fig. 10 — Structura telomerei la *S. lycopersicon*.

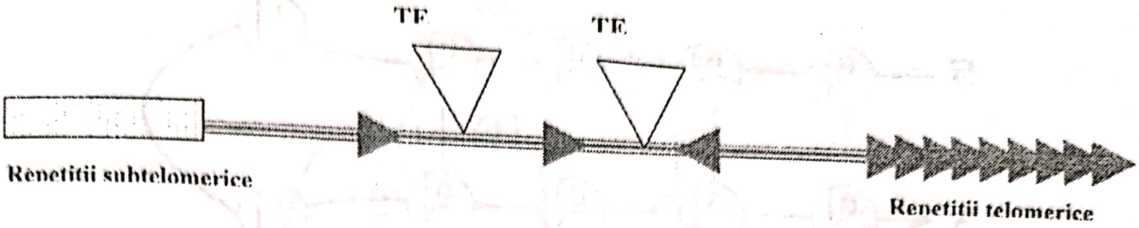


Fig. 11 — Organizarea telomerelor la *Arabidopsis thaliana*.

Iată cum se prezintă structura moleculară a telomerelor la *Arabidopsis thaliana* (fig. 11).

În anumite cazuri, apar repetiții telomerice interstițiale, aflate la distanțe mari față de capetele cromozomilor. Interesant apare faptul că asemenea repetiții interstițiale au fost identificate și în apropierea centromerului, unde se constituie ca un domeniu de aproximativ 500pb, format din repetiții telomerice degenerate, dispuse în tandem și separate de secvențe repetate, neînrudite cu repetițiile telomerice.

ADN telomeric prezintă, pe lângă o asimetrie moleculară, compozițională (o catenă bogată în G, catenă complementară bogată în C) și o asimetrie de lungime a celor două catene complementare, catena bogată în G-T, cu orientarea de la 5' la 3' având o prelungire monocatenară a capătului său 3', prelungire care cuprinde 14-16 nucleotide, devenind astfel mai lungă față de catena complementară, bogată în C.

În pofida așteptărilor legate de o asemenea asimetrie moleculară, fragmentele de ADN telomeric izolate nu revelează, ca mobilitate electroforetică, prezența unor asemenea prelungiri monocatenare.

Studiul unor oligonucleotide sintetice care au secvențe comparabile cu cele întâlnite în ADN telomeric a permis elaborarea unor modele prin care s-au deslușit unele dintre funcțiile telomerelor, printre care protecția față de atacul nucleazelor, asigurarea stabilității cromozomilor și recunoașterea secvenței telomerice de către proteine structurale specifice.

Datorită secvențelor lor neobișnuite, ADN-urile telomerice își pot asuma structuri neobișnuite în soluție. ADN telomeric, dublu catenar este susceptibil la digestie rapidă cu nucleaza Bal31. Când acest ADN adoptă configurații supraspiralizate, el capătă structuri neobișnuite ce pot fi foarte sensibile la digestie nucleazică, modificare chimică și invazie catenară, structuri care sunt adoptate și de alte duplexuri ADN, bogate în G.

Pe baza acestor date, s-a elaborat un model de pliere în buclă de tip agrafă de păr (*hairpin*) a prelungirii monocatenare a ADN telomeric (fig. 12), prin formarea

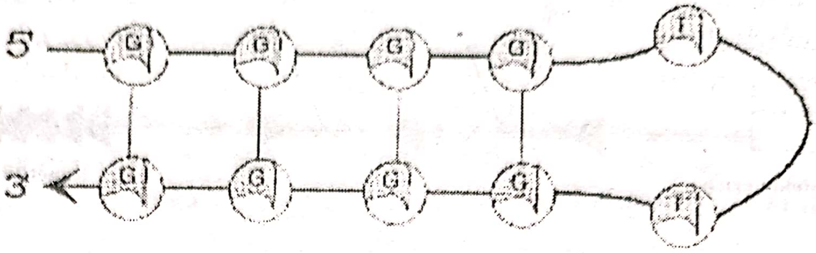


Fig. 12 — Structură hairpin (agrafă) pe care o poate lua prelungirea monocatenară a ADN telomeric, prin împerechere intracatenară.

unor împerecheri nespecifice între resturile de guanină, cu stabilitate medie, dar care pot interacționa cu proteine telomerice specifice, în vederea replicării fiind depliate și reconvertite în structură monocatenară. Acest model este aplicabil unor oligonucleotide scurte de 12-16 nucleotide.

În cazul în care prelungirea monocatenară este mult mai lungă, respectiv în care oligonucleotidul sintetic este mult mai lung, monocatena sa având orientarea generală 5'→3', va putea forma prin pliere patru sectoare bogate în G, dispuse într-o configurație mult mai complexă, amintind de cadrul metalic tetraped utilizat în mers de persoanele care au dificultăți de echilibru.

Aceste configurații mai complexe pot genera interacțiuni intramoleculare, în care pot fi implicate toate cele patru sectoare bogate în G ale monocatenei, devenind astfel interacțiuni tetracatenare.

Asemenea legături sunt foarte stabile și dependente de prezența ionilor de K^+ și Na^+. Ele stau la baza realizării unor helixuri cvadruple, stabilizate prin generarea unor domenii planare, ca urmare a formării de legături de tip Hoogsteen între patru resturi de G, aparținând la patru secvențe repetitive succesive (fig. 13). Stabilitatea tetrahelixului este amplificată și prin forțele de *stacking*, adică de stivuire a domeniilor planare, între planuri fiind plasat un ion de Na^+ sau K^+.

Asemenea structuri tetrahelicale apărute „in vitro“ nu sunt favorizate de condițiile „in vivo“, stabilitatea lor termodinamică și cinetica contrastând cu comportamentul dinamic al cromozomilor. Pe de altă parte, asemenea structuri tetrahelicale nu interacționează nici măcar „in vitro“ cu proteine structurale, specifice telomerelor, astfel că funcționarea lor „in vivo“ ar compromite activitatea cromozomală, bazată prin excelență pe interacțiuni multiple și complexe între ADN și proteine. Sunt însă unele date bazate pe analiza secvențelor telomerice umane, potrivit cărora ar fi posibilă adoptarea in vivo a unor asemenea structuri tetrahelicale. De altfel, asocierea cromozomilor omologi în meioză cu formarea bivalentului, respectiv a tetradei cromatidiale ar oferi frecvent posibilitatea de realizare de structuri

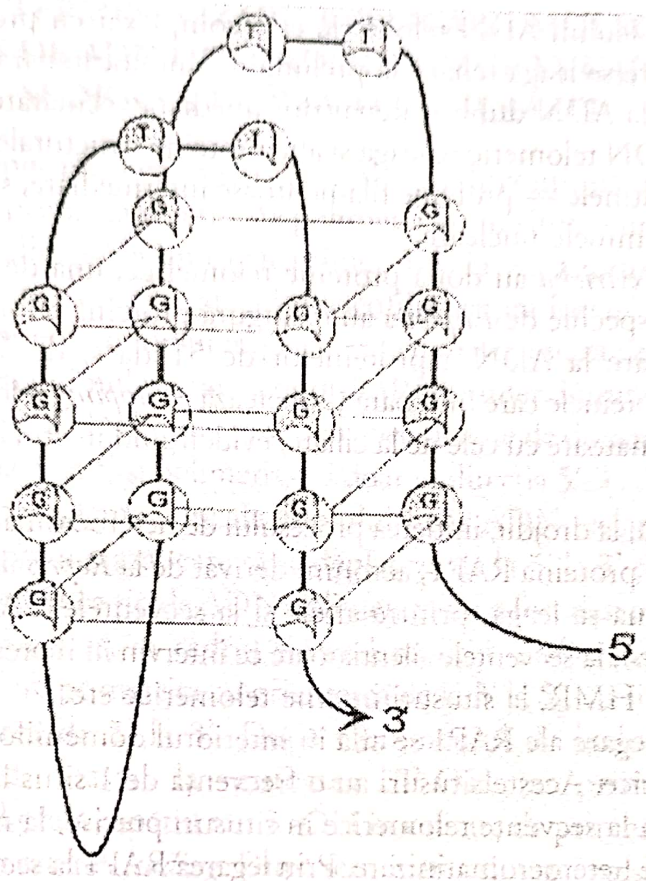


Fig. 13 — Modele de organizare a secvențelor telomerice:
a) helixuri cvadruple (tetrahelixuri).

tetrahelicale, la nivelul telomerelor cromozomilor meiotici, împerecheați în cadrul proceselor sinaptice ale meiozei.

Structurile intracatenare dublu-helicoidale denaturează la temperaturi de 40-50°C sau chiar sub aceste limite, deci cu mult sub temperatura de denaturare a formelor tetracatenare, mult mai stabile (Hederson și colab., 1987; Hardin și colab., 1993). Nu există însă dovezi care să ateste formarea „in vivo" a unui helix cvadruplu intra- sau intermolecular.

Stabilitatea cinetică și termodinamică extremă a acestei structuri tetracatenare formate in vitro este dificil a fi reconciliată cu o funcție dinamică ce ar trebui să fie in vivo. Dacă s-ar forma o asemenea structură tetracatenară, ea ar trebui să persiste, dată fiind jumătatea vieții sale pentru depliere, care este de ordinul a multor ore. Dovadă că o structură tetracatenară, bogată în G, nu poate fi utilizată in vivo, provine din demonstrarea directă că structura intramoleculară, tetracatenară nu se leagă in vitro de proteina structurală telomerică și nu este favorizată ca substrat pentru alungire de către telomerază (Cech, 1993).

În cadrul nucleului, ADN telomeric este complexat cu proteine structurale nonhistonice, care se leagă tenace la prelungirea monocatenară a catenei bogate în G, precum și la ADN dublu-catenar din imediata vecinătate.

In vitro, la ADN telomeric se leagă și alte proteine structurale nucleare precum laminele și vimentinele — proteine filamentoase intermediare, sugerând asocierea telomerelor cu laminele nucleare.

Speciile de *Oxytricha* au două proteine telomerice, una de 56 kda și alta de 41 kda, pe când speciile de *Euplotes* au o singură proteină telomerică de 51 kda. Situsurile de legare la ADN a proteinelor de 51kda și de 56kda sunt foarte asemănătoare. Proteinele care înfășoară (bonetează = *capping*) telomerele la *Xenopus* sunt foarte asemănătoare cu cele de la ciliate, evidențiind înaltul lor conservatorism în lumea vie.

Se știe acum că, la drojdii, inițierea procesului de heterocromatinizare telomerică este declanșată de proteina RAP1, acronim derivat de la *Repressor Activator Protein 1*. Această proteină se leagă, printre altele și la secvențele UAS (de la *upstream activation sequences*), la secvențele silențiatoare ce intervin în represia transcripțională a locilor HML și HMR, la situsuri interne telomerice etc.

Situsurile de legare ale RAP1 se află în interiorul domeniilor poli (G_{1}-$_{3}T$) ale secvenței telomerice. Aceste situsuri au o frecvență de 1 situs la 20 pb.

RAP1 se leagă la secvențe telomerice în situsuri precise, la nivelul cărora va fi inițiat procesul de heterocromatinizare. Prin legarea RAP1 la secvențele telomerice este elicitată legarea la RAP1 a heterodimerilor SIR3-SIR4. Acest heterodimer suferă apoi polimerizare, întinzându-se de-a lungul fibrei de cromatină, inducând heterocromatinizarea, prin care genele aflate într-un asemenea domeniu cromatinic supus heterocromatinizării vor fi silențiate. Complexul SIR3/SIR4 are efect represor asupra transcripției genice, prin modificările pe care le induce în structura histonelor H_3/H_4.

Proteina RAP1 are un domeniu de legare la ADN, un domeniu de activare, un domeniu rap_1s și un domeniu C-terminal. Domeniul C-terminal al proteinei SIR3 are unele similitudini cu proteinele laminei nucleare și se admite că este responsabil de ancorarea heterocromatinei de membrana internă a anvelopei nucleare, o caracteristică întâlnită la toate sistemele biologice nucleare, fiind legată, printre altele, și de segregarea corectă a cromozomilor în cursul mitozei la unele eucariote primitive.

La ciliatul *Oxytricha*, un heterodimer alcătuit dintr-o subunitate de 55kda și o altă subunitate de 41kda se leagă strâns, nu însă covalent, la secvențele telomerice, bogate în G. Proteinele care manifestă afinitate și se leagă la secvența telomerică protejează telomerele față de atacul nucleazelor, controlează dimensiunea telomerelor, reglează activitatea telomerazei. Tot asemenea proteine controlează dimensiunea telomerelor și reglează activitatea acestora, represează locii genici din imediata vecinătate a lor, conferind totodată stabilitate cromozomilor eucariotici.

6. DILEMA TERMINALIZĂRII REPLICĂRII MOLECULELOR LINIARE DE ADN DIN CROMOZOMUL EUCARIOTIC ȘI DESCOPERIREA TELOMERAZEI

Modelul de replicare semiconservativă și semidiscontinuă a cromozomului eucariotic implică primarea reacției de polimerizare cu sinteza unui ARN primer care oferă ADN polimerazei un capăt primer 3'-OH, cu ajutorul căruia enzima polimerazică poate să catalizeze atacul nucleofilic asupra fosfatului α din grupul 5'-P-P-P al deoxiribonucleotidului împerecheat cu matrița și, ca deoxiribonucleotid este unit covalent cu ultimul ribonucleotid al ARN primer, inițiindu-se astfel etapa de elongare a replicei. ADN polimerazele au specificitate de direcție, deplasându-se doar în direcția de la 3' la 5' și polimerizând doar în direcția 5'-3'. Antiparaleleismul celor două catene complementare ale dublului-helix ADN reclamă însă existența unui tip de ADN-polimerază, care să se deplaseze de la 5' la 3' și să polimerizeze de la 3' la 5'. Un asemenea tip de ADN polimerază nu a fost descoperit în sistemele biologice actuale. În plus, în cadrul sintezei replicei *leading*, are loc un singur eveniment de primare pe matrița cu orientarea de la 3' la 5', cu sinteza unui ARN primer cu orientarea de 5' la 3'. După evenimentul de includere a primului deoxiribonucleotid atașat la gruparea 3'-OH a primerului, fiecare deoxiribonucleotid oferă capătul său 3'-OH în calitate de primer (primer ADN), având loc elongarea catenei *leading*. După terminarea sintezei acestei catene *leading* are loc excizia primerului, de la capătul 5' al acestei catene replică. În urma acestei excizii a primerului, de la capătul 5' al catenei *leading*, rezultă un gol.

Pe catena *lagging*, au loc multiple evenimente de primare, cu sinteza de numeroși primeri ARN, fiecare fragment Okazaki având primerul său ARN. Excizia acestor primeri sub acțiunea unor nucleaze specifice, lasă goluri care sunt reparate sub acțiunea ADN polimerazei, apoi fragmentele Okazaki sunt unite covalent, într-o catenă replică unică, sub acțiunea ADN-ligazei.

În cazul sintezei și procesării *catenei lagging*, terminalul său 3' este complet, la acest terminal neexistând ARN primer, ci doar ADN nou sintetizat, astfel că, această catenă are o lungime egală cu lungimea matriței pe care a fost sintetizată și astfel, în acest caz, nu se ridică probleme ale terminalizării.

Cu totul alta este situația terminalului 5' al *catenei leading*. Unicul ARN primer care este sintetizat la capătul 5' al *catenei leading* este excizat și nu există nici o ADN polimerază care să poată repara golul rămas în urma exciziei acestui ARN primer, deoarece nu are cine să-i ofere un capăt 3'-OH, spre a putea realiza polimerizarea de deoxiribonucleotide, prin care s-ar putea umple un asemenea gol. Un asemenea gol rămas neumplut, în decursul numeroaselor runde de replicare, ar face ca molecula de ADN să se scurteze progresiv și să piardă gene, ceea ce ar fi incompatibil cu viața. Or, dacă nu ar fi fost un mecanism eficient care să asigure umplerea golului rămas în urma exciziei ARN primer, de la capătul 5' al *catenei leading*, și care să păstreze constanța lungimii cromozomilor eucariotici (cu molecule *liniare* de ADN) și astfel să conserve conținutul lor informațional, nu ar fi fost posibilă continuitatea vieții pe Terra. Strădaniile de a descoperi și de a descifra un asemenea mecanism au fost încununate de succes, prin descoperirea enzimei responsabile de umplerea unui asemenea gol de la capătul 5' al *catenei leading* și de păstrarea lungimii constante a cromozomilor eucariotici și respectiv a integrității structurale a telomerelor acestor cromozomi.

Este de reținut faptul că, la procariote, terminalizarea replicării nu ridică asemenea probleme, deoarece aici cromozomul, având formă circulară, nu prezintă capete libere și terminalizarea este un proces care se realizează precum se desfășoară întregul mecanism, pe oricare sector al cromozomului circular.

Trebuie menționat că s-au propus unele modele speculative pentru a explica terminalizarea replicării cromozomului eucariot, printre care și modelul lui Cavalier-Smith, potrivit căruia, înainte de a fi replicați, toți cromozomii fiecărui set haploid din celula diploidă se asociază telomeră-la-telomeră, formând o gigantică structură supracromozomală circulară, care este replicată după modelul oricărei structuri genetice circulare, eliminându-se constrângerile existenței capetelor libere. După terminalizarea replicării, o endonuclează degajează cromozomii individuali din structura supracromozomală circulară, astfel că aceștia se pot comporta în mod normal, în cursul diviziunii. Dar, descoperirea telomerazei a trimis în domeniul speculațiilor un asemenea model.

Mecanismul terminalizării replicării cromozomului eucariot implică intervenția unei enzime speciale, descoperită de către Elizabeth H. Blackburn și colaboratorii, în anul 1984, la ciliatul *Tetrahymena thermophila*. Ulterior, ea a fost identificată și la alte specii, incluzând specia umană. Activitatea telomerazică a fost testată in vitro și s-a constatat că un oligonucleotid ADN telomeric sintetic, bogat în G, care reprezintă, în fond, o telomeră, poate fi alungit prin polimerizarea (în direcție de la 5' la 3') de deoxiribonucleotide trifosfat, în repetiții în tandem ale secvenței telomerice a speciei de la care a fost izolată telomeraza. Această reacție nu necesită ATP. In vitro, telomeraza manifestă specificitate pentru primeri oligonucleotidici ADN monocatenari, bogați în G, cu diferite secvențe și se admite că și in vivo are aceleași proprietăți. Activitatea telomerazică a fost clar evidențiată în extracte de culturi de celule sau țesuturi, precum extractele din celulele imortalizate *HeLa*.

Așadar, telomeraza apare ca o enzimă care previne scurtarea telomerelor cu fiecare ciclu de replicare, prin adăugarea de secvențe telomerice noi, la capătul 3' al catenei ADN bogate în G, utilizând o matriță proprie ce constituie partea prostetică a acestei enzime, care este un oligoribonucleotid (ARN), bogat în resturi C. Capătul 3' al catenei ADN bogate în G are valoare de capăt primer. Astfel, telomeraza este o ribonucleoproteină și se mai numește și *telomer-terminal-*

transferază. Această enzimă aparține clasei ribonucleoproteinelor (RNP) care sunt implicate în multe procese legate de sinteza proteinelor, procesarea ARNr, splicing-ul ARNm și maturarea ARNt, componenta lor prostetică ARN determinând specificitatea reacției prin capacitatea acesteia de a recunoaște și de a se lega complementar la substraturi potrivite, reprezentate de ARN sau ADN.

Componenta ARN a telomerazei recunoaște și se leagă la capătul 3' al catenei ADN telomeric, bogate în G și servește în același timp ca matriță în cadrul procesului de adăugare, la acest capăt 3', de noi repetiții telomerice.

Utilizând o matriță ARN și polimerizând deoxiribonucleotide, telomeraza este, de fapt, o reverstranscriptază originală, diferită însă de alte enzime din acest grup, prin aceea că matrița ARN este înglobată în structura enzimei polimerizatoare. Cu unele excepții, secvența motiv a telomerelor (TTAGGG)$_n$ a fost înalt conservată în cursul filogeniei, fapt evidențiat la multe specii de plante și animale, inclusiv la cele peste 100 de specii diferite de vertebrate. Iată redată, în tabelul de mai jos, motivul repetiției telomerice, la câteva specii:

Specia	**Repetiția telomerică**
Homo sapiens	TTAGGG
Physarium polycephalum (mucegai)	TTAGGG
Didymium sp. (mucegai)	TTAGGG
Neurospora crassa (ciupercă filamentoasă)	TTAGGG
Trypanosoma sp. (protozoar)	TTAGGG
Crithidia sp. (protozoar)	TTAGGG
Tetrahymena sp. (protozoar)	GGGGTT
Glaucoma sp. (protozoar)	GGGGTT
Paramecium sp. (protozoar)	GGGG(GT)TT
Oxytricha sp. (protozoar)	GGGGTTTT
Stylonichia sp. (protozoar)	GGGGTTTT
Euplotes sp. (protozoar)	GGGGTTTT
Plasmodium sp. (protozoar)	AGGGTT(TC)
Arabidopsis thaliana (plantă cruciferă)	TTTAGGG
Chlamydomonas reinhardtii (algă verde unicelulară)	TTTTAGGG
Saccharomyces pombe (drojdie)	(A)G_{2-5}TTAC
Saccharomyces cerevisiae (drojdie)	G_{1-3}T
Dictyostelium discoideum (mucegai)	G_{1-8}A

La ciliatul hypotric *Stylonychia lemnae*, secvența motiv telomerică este $C_4A_4C_4A_4C_2$ și nu este restrictă doar la capetele cromozomilor. Există cazuri de specii de vertebrate la care se întâlnesc secvențe telomerice în proximitatea centromerului unor cromozomi, acesta fiind un ADN ancestral derivat în urma fuziunii centromerilor cromozomilor acrocentrici/telocentrici, prin mecanisme robertsoniene de fuziune centrică.

La *Tetrahymena*, secvența 3' TTGGGG 5' reprezintă motivul repetițiilor telomerice în tandem, astfel că, telomeraza are în ARN-ul său o secvență complementară 5' CAACCCCAA 3' și polimerizează doar dGTP și dTTP. Lungimea componentei ARN din telomeraza de la *Tetrahymena* are 159 ribonucleotide, pe când la *Euplotes* această componentă ARN are o lungime de 192 ribonucleotide. Din această lungime a ARN matriță (componenta prostetică a telomerazei) doar o secvență de 15-22 ribonucleotide este identică cu repetițiile telomerice ale catenei ADN bogate în C+A și aceasta servește ca matriță pentru sinteza secvențelor repetitive ale catenei bogate în G, asigurând astfel sinteza ADN telomeric.

Activitatea telomerazei este discontinuă. Ea se asociază cu primerul 3' al catenei bogate în G și adaugă la acesta 15-22 de nucleotide complementare matriței sale ARN, după care suferă o translocare la capătul 3' al ultimului nucleotid adăugat catenei bogate în G, reluând polimerizarea de deoxiribonucleotide prin care se realizează alungirea acestora ș.a.m.d. Activitatea telomerazei o putem asemui cu mersul omidei de fluture cotar, pe o creangă sau pe fire de iarbă.

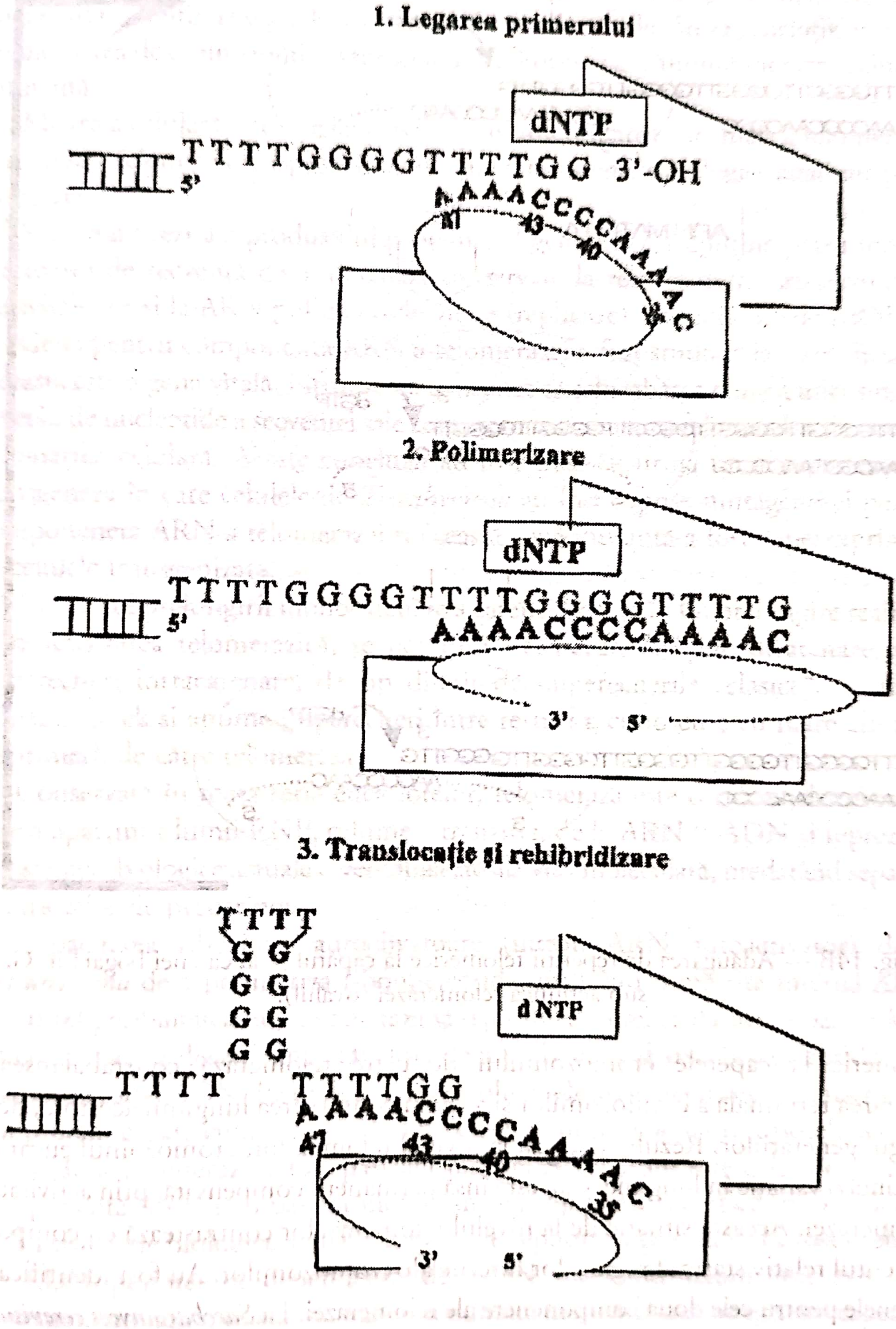
La celelalte specii de ciliate (*Oxytricha* și *Euplotes*) ca și în celulele umane, telomerazele specifice acestora au același comportament ca al telomerazei de la *Tetrahymena*.

Telomeraza sintetizează (alungește) doar catena bogată în G a ADN telomeric (fig. 14). Sinteza catenei complementare, bogată în C+A este asigurată printr-un mecanism de sinteză discontinuă, mediat de primază-polimerază, tipic pentru sinteza semiconservativă.

Catena bogată în G+C este alungită pulsatoriu către un tronson, asigurându-se realizarea lungirii normale a ADN, caracteristică cromozomului, respectiv speciei considerate.

Dovedirea prezenței componentei ARN în telomerază s-a facut utilizându-se tratamentul cu RN-ază. Acesta a anihilat activitatea telomerazei.

Dovadă că secvența 5'CAACCCCAA 3', din componeneta ARN a telomerazei de la *Tetrahymena*, este matriță pentru sinteza telomerei a fost adusă de mutageneza direcționată spre situs, la nivelul genei pentru această componenetă și superexpresia genei care a suferit mutație în celulele transformate de *Tetrahymena*. Utilizându-se acest procedeu, s-a putut evidenția sinteza de telomere noi, in vivo, a căror secvență corespunde secvenței matriță care a suferit mutație. Adăugarea continuă de ADN


1. Legarea primerului

2. Polimerizare

3. Translocație și rehibridizare
dNTP
TTTTGGGGTTTTGG 3'-OH
5'
AAAACCCCAAAAC
51
43
40
35
dNTP
TTTTGGGGTTTTGGGGTTTTG
5'
AAAACCCCAAAAC
3'
5'
TTTT
GG
GG
GG
GG
d NTP
TTTT
TTTTGG
AAAACCCCAAAAC
47
43
40
35
3'
5'

Fig. 14A — Modul de acțiune al telomerazei.

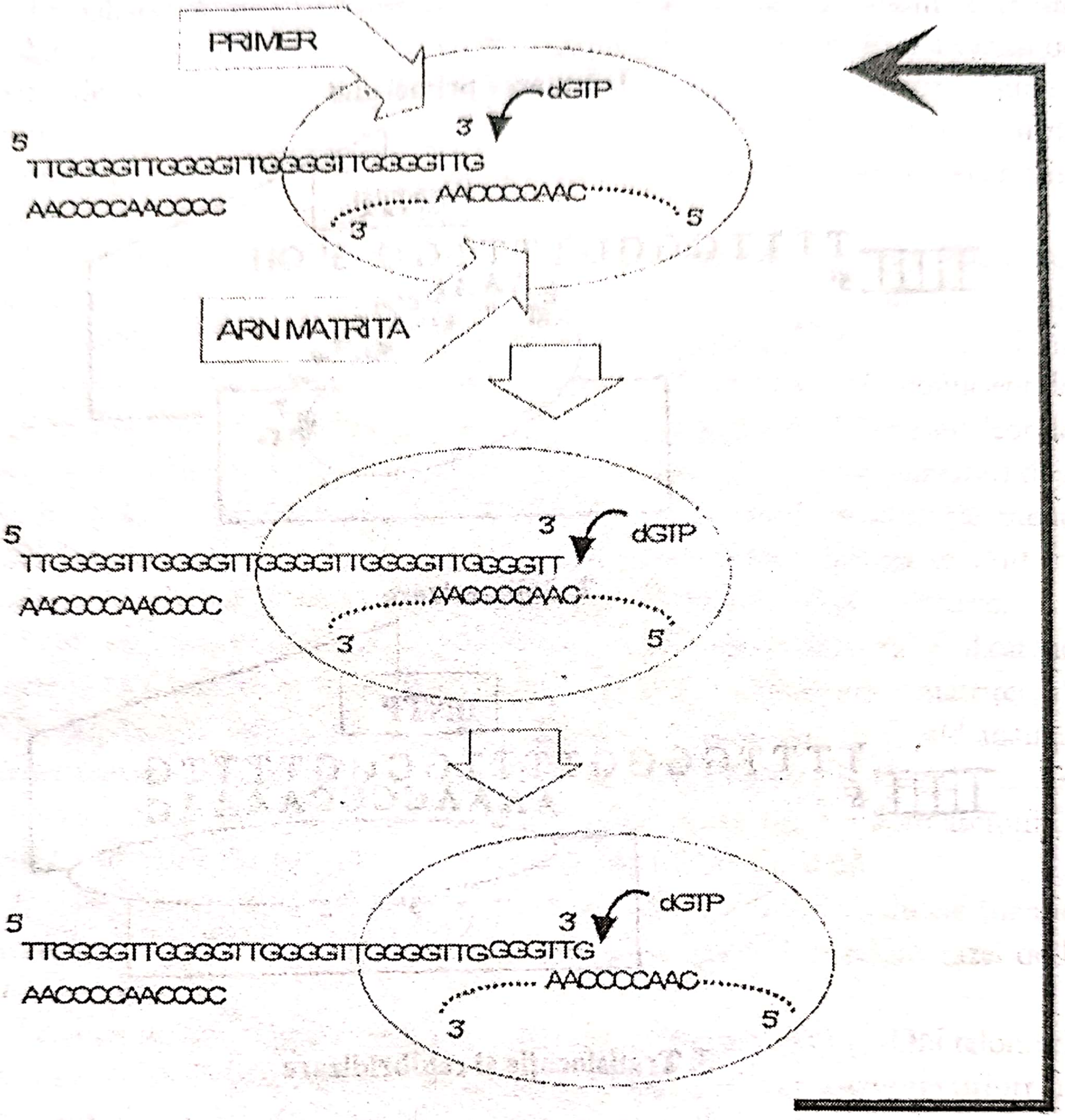

PRIMER
dGTP
3
5
TTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTG
AACCCCAACCCC
AACCCCAAC
3
5
ARN MATRITA
5
3
dGTP
TTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTT
AACCCCAACCCC
AACCCCAAC
3
5
dGTP
5
3
TTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTG
AACCCCAAC
AACCCCAACCCC
3
5

Fig. 14B — Adăugarea de repetiții telomerice la capătul 3' al catenei bogată în G, sub acțiunea telomerazei (ovalul).

telomeric la capetele cromozomului de către telomerază contrabalansează scurtarea terminală a cromozomilor și asigură conservarea lungimii acestora, de-a lungul generațiilor. Rezultă deci că, la nivelul telomerelor, cromozomul eucariot prezintă o variație în lungime, care este însă permanent compensată, prin activitatea telomerazei. Aceasta situație de la nivelul telomerazelor contrastează cu comportamentul relativ static al regiunilor interne ale cromozomilor. Au fost identificate și genele pentru cele două componenete ale telomerazei. La *Saccharomyces cerevisiae*, gena *EST1* codifică pentru componeneta proteinică a telomerazei. Acronimul EST derivă de la expresia engezească *Ever Shorter Telomeres* (telomere chiar mai scurte). Mutantele *est* 1 de la *Saccharomyces cerevisiae* prezintă un fenotip dominant negativ, cu o scurtare continuă și gradată a telomerelor, în decurs de câteva generații, asociată cu pierderea de cromozomi și senescență, ca procese care anunță moartea celulară iminentă.

Moartea celulară este asociată, așadar, cu funcționarea anormală a telomerazei și scurtarea telomerelor, aspecte întâlnite în toate sistemele biologice analizate până în prezent.

Secvența prezisă a produsului proteinic al genei *EST 1* conține patru motive (sectoare) de secvență de aminoacizi conservate la retrotranscriptazele virale și nonvirale, ca și la ARN polimerazele virale (replicaze), dependente de ARN.

Gena pentru componenta ARN a telomerazei a fost studiată la *Tetrahymena*. Aceasta este o genă vitală, întrucât s-a constatat că schimbarea chiar a unei singure perechi de nucleotide a secvenței sale compromite activitatea telomerelor și conduce la moartea celulară. Aceste concluzii au fost trase în urma unor experiențe de transgeneză în care celulele de *Tetrahymena* au fost supuse mutagenezei pentru componeneta ARN a telomerazei și această genă mutantă a fost superexprimată în celulele transgenizate.

La nivelul prelungirii monocatenare a catenei bogate în G, prelungire realizată prin activitatea telomerazică, se pot forma structuri *hairpin*, bicatenare, prin împerecheri intracatenare, de tip diferit de împerecherile „clasice", normale, Watson-Crick și anume împerecheri între resturi recunoscute cu mare afinitate ca primeri, de către telomerază.

Conservată în toată seria eucariotelor, telomeraza este o ribonucleoproteină care a aparținut lumii RNP, o lume a tranziției de la ARN la ADN și reprezintă în sistemele biologice actuale o veritabilă „fosilă vie" moleculară, predatând separării eucariotelor de procariote.

Capacitatea ribozimei autoclivatoare (intron ARN autoactivator) de la *Tetrahymena* de a polimeriza ribonucleotide, utilizând o matriță internă ARN, sugerează posibilitatea ca și telomeraza să reprezinte un relict al unei ribozime ARN replicaze, care a devenit însă capabilă de a polimeriza deoxiribonucleotide și de a sintetiza astfel ADN. Pe măsură ce au evoluat, ele au generat reverstranscriptaze pur proteinice, așa cum sunt întâlnite acestea la eucariotele și procariotele actuale, pe când, la telomerază a fost păstrată matrița ARN și nu este exclus ca această componentă ARN să fi păstrat încă și unele proprietăți catalitice (ribozimice).

În sistemele biologice actuale, funcția de replicare a genomului a fost preluată de ADN polimerază dependentă de ADN, pe când telomeraza care este reverstranscriptază specializată, este încă utilizată în menținerea integrității capetelor libere ale cromozomilor eucariotici.

În sisteme biologice precum *Saccharomyces cerevisiae, Kluyveromyces, Plasmodium, Paramecium,* ca și în celulele umane, în cultură, s-a constatat fenomenul de „vindecare" a capetelor rupte ale cromozomilor, în urma adăugării directe de repetiții telomerice, la asemenea capete cromozomale rupte. Procesul de „vindecare" telomerică se realizează prin adăugarea de novo de secvențe telomerice la capetele cromozomale lipsite de telomere, ca urmare a ruperii cromozomale, în urma acțiunii radiațiilor.

Lungimea domeniilor telomerice este clar controlată genetic, numărul repetițiilor telomerice de la capetele cromozomilor fiind asigurat de echilibrul stabilit între procesele de alungire și cele de scurtare a telomerelor. Dezechilibrarea acestei balanțe conduce fie la scurtarea progresivă a telomerelor, în cadrul rundelor succesive de replicare, fie la creșterea lungimii domeniilor telomerice, uneori cu până la 2Kpb.

Funcția vitală a telomerazelor este aceea de a menține relativ constantă lungimea domeniilor repetițiilor telomerice și prevenirea pe această cale a pierderii de material genetic, asociată cu senescență și moarte celulară.

Scurtarea cromozomilor este un proces natural doar în anumite țesuturi, ceea ce denotă faptul că telomeraza are activitate cu specificitate tisulară. În țesuturi tumorale, are loc uneori creșterea lungimii telomerelor, alteori se înregistrează fenomenul exact opus, de scurtare a lungimii telomerelor.

La *Drosophila melanogaster,* retroelemetele asigură evitarea procesului de scurtare a telomerelor, ceea ce face ca activitatea telomerazică să fie superfluă. Aceste retroelemente sunt grupate în clusteri, în jurul capetelor cromozomale, fiind alcătuite dintr-un număr de repetiții terminale diferite de repetițiile telomerice bogate în G, așa cum ar fi normal de așteptat. Astfel, există date potrivit cărora telomerele de la *Drosophila* sunt completate nu printr-o activitate telomerazică, ci prin adăugarea ocazională a câtorva kilobaze din aceste retroelemente, la capetele cromozomului.

În celulele somatice, activitatea telomerazică este mai redusă, decât în linia germinală, explicându-se astfel de ce telomerele din cromozomii spermatozoizilor sunt mai lungi decât cele ale cromozomilor din celulele somatice. Totodată, în aceasta constă și explicația pentru care telomerele devin din ce în ce mai scurte, odată cu înaintarea în vârstă, în celulele somatice și ceva mai lungi, în spermatozoizi. La om, telomerele au aproximativ 15 Kpb, în spermatozoizi, și 10 Kpb în celulele somatice. Rundele succesive de diviziuni ale celulelor somatice ar trebui să conducă la diminuarea lungimii acestor telomere, fapt înregistrat în anumite cazuri. La șoarece (*Mus musculus*) nu se constată vreo diferență în lungimea telomerelor din celulele somatice față de celulele liniei germinale, după cum nici scurtarea telomerelor, pe măsura înaintării în vârstă, nu se înregistrează.

S-a arătat că introducerea repetițiilor TTAGGG, în celule transgenizate, induce formarea de telomere în multe tipuri de celule de mamifere. Așa numitele repetiții subtelomerice sunt foarte comune și înalt variabile, atât ca număr, cât și din punct de vedere al compoziției.

Prezența repetițiilor subtelomerice este o caracteristică foarte variabilă. Astfel, în cariotipul de la cimpanzeu se întâlnesc aproximativ 21 benzi subtelomerice care nu se întâlnesc în cariotipul uman, în ciuda unei omologii de 98% dintre cariotipurile celor două specii. Această diferență are la bază prezența la cimpanzeu a unui ADN satelit care are 32 perechi de baze și este bogat în AT. Alterarea experimentală a telomerazei de la *Tetrahymena* a condus la alterarea secvenței de nucleotide a telomerelor, ceea ce a generat fenotipuri similare cu *est1*, de la drojdie.

În microscopia electronică, telomerele prezintă ADN parțial despiralizat, prezentând bucle de aproximativ 89 nm diametru evidențiate și în cromozomii de dinoflagelate și euglenoficee (Gavrilă, 1996; Gavrilă și Chaudhari, 1996).

În celulele transformate malign ca și în cazul sindromului Bloom, în care apar defecte ale mecanismului de reparare a ADN, se constată fuziuni cap-la-cap, adică telomeră-la-telomeră, ale cromozomilor. Se afirmă că asemenea asocieri intercromozomale sunt consecința reducerii repetițiilor telomerice, respectiv a lungimii telomerelor.

În cazul în care se realizează culturi de celule în care se induce procesul de scurtare telomerică, acesta are loc cu fiecare rundă de diviziune. De îndată însă ce se realizează transformarea celulelor și ele devin imortalizate, procesul de scurtare a telomerelor încetează, în sincronie cu reducerea activității telomerazei. Și totuși, telomerele, în acest caz, nu cresc peste lungimea specifică lor, deoarece activitatea telomerazică este supusă unui control reglator strict, care asigură menținerea lungimii telomerelor, în limitele normale ale speciei.

Integritatea telomerelor este asigurată prin formarea unei structuri *hairpin*, pe baza prelungirii monocatenare a catenei bogată în G. Nu este exclus ca prin pliere înapoi, să se realizeze o unire covalentă a capătului 3'-OH al acestei prelungiri monocatenare, a catenei bogate în G, cu capătul 5' al catenei bogate în C și astfel să aibă loc o circularizare a duplexului ADN de la nivelul telomeric, conferindu-se astfel telomerei o anumită stabilitate. Acestă stare covalentă închisă a terminalului unui duplex ADN ar putea fi tranzientă, dar ea ar putea fi realizată în perioada în care nu are loc replicarea ADN.

Repararea capetelor rupte ale cromozomilor prin intervenția telomerazei ("vindecarea" sau mai plastic am putea spune „cicatrizarea" capetelor rupte ale cromozomilor) a fost sugerată de constatarea că acei cromozomi care prezintă deleții terminale nu devin totdeauna mai scurți cu fiecare rundă de diviziune. Astfel, capetele scurte ale cromozomilor își refac telomerele sub acțiunea telomerazei. Acest fapt este dovedit la *Ascaris lumbricoides* și reprezintă un proces natural ce are loc în urma pierderii cromatinei din celulele presomatice ale embrionului acestui vierme cilindric.

"Vindecarea" capetelor cromozomale a fost demonstrată și la cromozomii de drojdie care, spre deosebire de celulele umane, poate să-și păstreze integritatea celulară, cu un balast mutațional mai mare. La drojdii s-a mai constatat că dacă cromozomul este lipsit de o singură telomeră, el poate supraviețui, dar dacă este lipsit de ambele telomere, atunci are loc eliminarea sa. Se descrie un fapt remarcabil, și anume acela că telomerele permit celulei să recunoască ADN -ul care este lezat. Utilizarea telomerelor ca puncte de recunoaștere a cromozomilor intacți poate fi un mecanism larg răspândit în lumea vie. În acest caz, putem vorbi de valoarea telomerelor ca biosenzori moleculari ai leziunilor din ADN al altor cromozomi.

La om, în anumite condiții patologice, precum este sindromul Wolf-Hirschhorn, în care apare deleția brațului scurt al cromozomlui 4, ca și sindromul Miller-Dieker, care este asociat cu deleția brațului scurt al cromozomului 7, delețiile relativ mici ale materialului cromozomal din capetele cromozomilor generează insufucientă genică haploidă, cu efecte detrimentale severe.

În celulele tumorale, rupturile cromozomale și translocațiile criptice pot fi stabilizate prin capturarea de repetiții telomerice din alți cromozomi. Acest aspect este de covârșitoare importanță în etiologia implicării cromozomului 6 în melanoame.

În tumorile craniene, telomerele sunt mai lungi decât în cromozomii din celulele sangvine, în 41% dintre cazuri, și mai scurte, în 21,7% dintre cazuri, restul de 36,7 dintre cazuri având lungime normală. Aceasta denotă că activitatea telomerazică, în aceste cazuri este, fie supraexprimată, fie subexprimată, fie că rămâne neschimbată. În cancer ovarian uman s-a remarcat activarea telomerazei, ceea ce previne instalarea senescenței celulare și moartea celulară, prin pierdere de cromozomi.

La om, telomerele din linia germinală sunt mai lungi decât cele din linia somatică, ceea ce denotă o activitate telomerazică mai redusă, în celulele somatice, cu o progresivă pierdere de cromatină, ceea ce reprezintă semnul unui mecanism de programare a senescenței celulare.

Imunosenescența precoce, înregistrată în cazurile cu sindrom Down, este consecința directă a pierderii excesive de telomere.

Deși Muller a imaginat existența unei structuri tip telomeră, lucrând pe *Drosophila melanogaster*, paradoxul științific face ca această musculiță de fructe să nu aibă o repetiție telomerică, la capetele cromozomilor săi. De aici, s-a dedus că trebuie să existe un alt mecanism care să asigure integritatea capetelor cromozomale la *D.melanogaster*. Pentru o perioadă de 40 de generații, musculițele cultivate pierd în medie cam 76 perechi de baze, per generație din capetele cromozomului, ceea ce ar duce la pierderea de cromozomi întregi, ceea ce nu are loc, în realitate. Explicația constă în faptul că un transpozon adaugă cu intermitență blocuri mari de „ADN de sacrificiu" la capetele cromozomului, ca urmare a intrării în funcțiune a unui declanșator, în momentul în care scurtarea capătului cromozomului atinge un punct critic.

Telomerele nu au doar o funcție structurală, ca apărătoare ale integrității structurale a cromozomului eucariotic, ci și una de activitate genică, afirmație bazată pe analiza mecanismului prin care flagelatele parazite tripanosome, din genurile *Trypanosoma sp.*, *Neisseria gonorrhoea* și *Borrelia sp.*, pot realiza evaziunea sistemului imunitar umoral al gazdei. Tripanososmele au o glicoproteină variabilă de suprafață a cărei expresie este controlată de poziția fizică a genei în cromozom, față de telomeră. Cazul este binecunoscut la *Trypanosoma sp.*, un parazit comun al vertebratelor, deși, în mod obișnuit gazda sa vertebrată este asimptomatică. Numai la animalele domestice, și mai ales, la om, *Trypanosoma* este patogenă. În Africa, *T. gambiense* și *T. rhodensiense* sunt transmise de musca tze-tze (*Glossina sp.)* și provoacă boala somnului. În America de Sud, *T.cruzi* este transmisă de hemipterul *Rhodnius* și provoacă boala Chagas. Unele specii de *Trypanosoma* sunt capabile de a evita răspunsul imun umoral al gazdei. Calea prin care se realizează o asemenea evaziune a sistemului imunitar al gazdei este legată de funcționalitatea telomerei parazitului.

Trypanosoma brucei are aproximativ 20 de cromozomi mari, dispuși mai mult sau mai puțin în perechi, deși dimensiunea lor variază considerabil între omologi. Totodată, această specie are aproximativ 100 minicromozomi. Fiecare tripanosomă are în genomul său aproximativ 1000 copii diferite ale genei care codifică pentru glicoproteina variabilă de suprafață (VSG- de la *variant surface glycoprotein*) care îi conferă tripanosomei un înveliș antigenic unic. Schimbarea de la un anumit tip de antigen (VSG) la un alt tip de asemenea antigen de suprafață permite tripanosomei să trăiască nestingherită în sângele gazdei, pentru că aceasta nu va fi capabilă să sintetizeze cantitatea de anticorpi pentru un anumit tip de antigen VSG, suficientă spre a anihila acest tip de antigen, deoarece parazitul își schimbă periodic tipul de antigen VSG, astfel că sistemul imunitar al gazdei trebuie să sintetizeze de fiecare dată un alt tip de anticorp, corespunzător noului tip de antigen VSG produs succesiv. Și când cantitatea de anticorp sintetizată de această dată, pentru noul tip de antigen VSG, s-ar apropia de nivelul care să asigure un răspuns imun eficient, din nou parazitul își schimbă antigenul VSG ș.a.m.d.

O cursă „nedreaptă" între parazit și gazdă, în care parazitul „păcălește" de fiecare dată gazda, tocmai când aceasta se pregătește să dea lovitura de grație! Sistemul imunitar al gazdei este suprasolicitat, dar este făcut ineficient, prin „viclenia"

inv. 158020

intrusului și astfel are loc epuizarea gazdei, cu simptomatologia caracteristică a „bolii somnului".

În ce constă această „viclenie" a tripanosomei? Dintre cele peste 1000 de variante ale genei pentru VSG, localizate în diferiți loci, în numeroșii săi cromozomi, tripanosoma mobilizează o singură copie într-un situs de expresie, aflat la nivelul unei telomere a unuia dintre cromozomi. Astfel, această copie genică ce urmează a fi exprimată, este translocată într-o regiune de control, aflată în apropierea telomerei unuia dintre cromozomi. Acest eveniment apare cu o rată de 10^{-2}-10^{-6}, pe diviziune celulară. Astfel, în populația de parazit din sângele bolnavului se află numeroase clone de *Trypanosoma* și, pe când unele sunt totuși eliminate, sub acțiunea anticorpilor produși de gazdă, altele sunt în formare sau pe cale de expansiune (fig.15).

Studiul scurtării telomerelor la diferite specii, incluzând *Tetrahymena* a dovedit că acest proces stă la baza senescenței și morții celulare. Dacă inițial s-a considerat că senescența se datorează pierderii de material genetic ca urmare a reducerii domeniilor telomerice, prin reducerea activității sau chiar inactivarea telomerazei, acum se știe că și celulele senescente pot fi stimulate să se dividă și chiar să devină

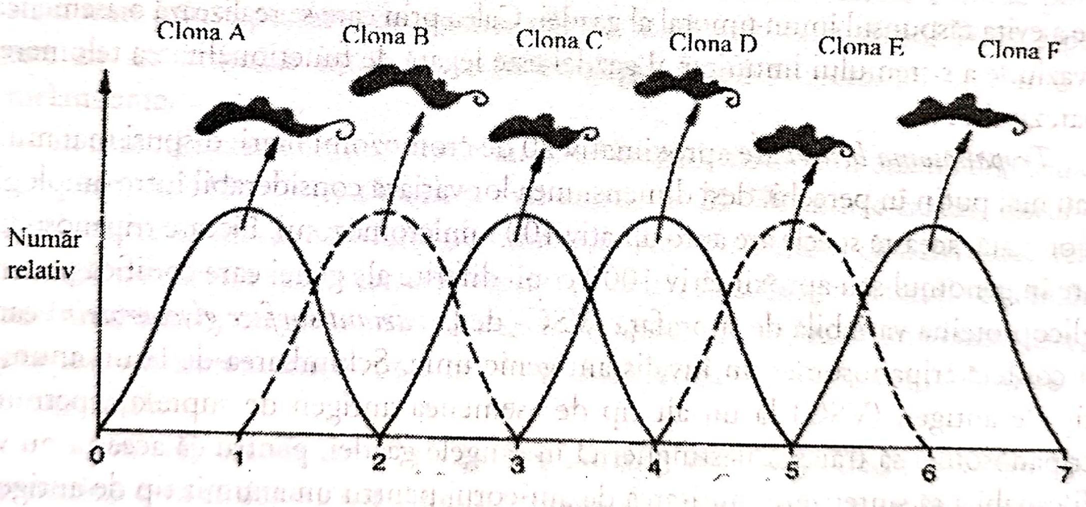


Fig. 15 — Evoluția infecției cu Trypanosoma

De obicei, în momentul infecției, sunt introduși în gazdă puțini paraziți. Aceștia proliferează dând clona A. La câțiva indivizi ai acestei clone A are loc translocarea genei VSG în situsul telomeric de exprimare, astfel că sistemul imunitar al gazdei este nevoit să răspundă la infecția provocată de această nouă clonă a parazitului, desemnată clona B, care este deja în curs de proliferare. Pe când clona A este eliminată, clona B își crește numărul de indivizi. Procesul de apariție de noi clone, prin translocarea telomerică a altei variante a genei VSG continuă în aceeași manieră, realizându-se de fapt, o veritabilă evaziune a sistemului imunitar al gazdei (din Clark și Wall, 1996).

nemuritoare. De aici, s-a dedus că procesele de senescență și de moarte celulară sunt reversibile, fiind mai curând determinate prin modificarea activității unor gene adiacente telomerelor, decât prin pierderea fizică de gene. În cadrul unui asemenea model de activitate genică s-a propus intervenția unei prezumtive gene care represează programul ce declanșează senescența celulară, genă desemnată *SenR*. Totodată s-a dedus că viabilitatea celulară și funcționarea genei *SenR* sunt condiționate de poziția heterocromatinei telomerice.

7. TELOMERELE ȘI MEDICAMENTELE

Catena bogată în G a telomerei este singura secvență esențială din ADN cromozomal, cunoscută a fi sintetizată prin copierea unei secvențe scurte de ARN. Acest mod unic de sinteză, de structură specială și de comportament al ADN telomeric sugerează că sinteza telomerei ar putea fi o țintă pentru acțiunea selectivă a medicamentelor și a altor agenți. Deoarece activitatea telomerazei apare a fi esențială pentru protozoare și drojdii, dar aparent nu și pentru celulele somatice ale mamiferelor, Elizabeth H.Blackburn (1993) propune ca telomeraza, să fie explorată ca țintă pentru medicamentele utilizate împotriva microorganismelor patogene sau parazite precum protozoarele parazite sau drojdiile patogene. Un medicament care se leagă selectiv la telomerază fie prin reverstranscriptaza sa, fie prin propreitățile de legare la substratul ADN ar acționa selectiv împotriva menținerii prelungite a eucariotului inferior în diviziune, dar nu ar prejudicia gazda-mamifer, pe termen scurt, deoarece, la aceasta, activitatea telomerazică, în celulele somatice este scăzută sau absentă. Printre aceste medicamente trebuiesc considerate cele care se leagă selectiv la forme împerecheate G.G sau la catene cu protruziuni, bogate în G, de la terminalii cromozomali sau agenți care stabilizează o formă necorespunzător împerecheată G., blocând la aceasta adaptarea unei structuri necesare pentru funcția corespunzătoare in vivo.

TELOMERELE AU FOST DESCRISE CA VERITABILE CĂLCÂIE ALE LUI ACHILE pe care le au cromozomii la eucariote, și aici ar trebui îndreptate strategiile medicației față de patogeni și paraziți reprezentați de protozoare și drojdii.

8. CROMOZOMII ARTIFICIALI

Primele cercetări în acest domeniu au început odată cu clonarea unei origini de replicare independentă, dar nu și de transmitere stabilă prin diviziuni celulare. Aceste plasmide, încorporând origini de replicare de la drojdii, au reprezentat prima etapă în edificarea unui cromozom artificial. Următoarea etapă a fost reprezentată de clonarea și incorporarea elementului care este răspunzător de controlul mișcării cromozomului în cursul diviziunii celulare, adică a centromerului. Această etapă a fost realizată de Clarke și Carbon. Astfel, plasmidele constituite prin incorporarea unui centromer sunt moștenite în 99% din diviziunile celulare. Plasmidele acestea trebuiau să fie circulare, adică fără capete libere, pentru a nu se pirde ADN în cursul replicării. Pentru a se construi plasmide liniare era necesară inserția unor secvențe specifice telomerelor. Inițial au fost utilizate telomere de la protozoare, după care și de la drojdii. Introduși în celule de drojdie, asemenea cromozomi artificiali au avut la început formă circulară, dar prin clivare la nivelul secvențelor telomerice, ei devin liniari. Primii cromozomi artificiali de drojdie de 11kb denumiți YAC (de la *Yeast Artificial Chromosomes*) au fost instabili în cursul diviziunii, având segregarea randomizată. În mare măsură, stabilitatea YAC-urilor este dependentă de dimensiunea lor, cei mai mici nefiind tot atât de stabili ca cei mari. Un YAK de 200 kb este înalt stabil, în cursul mitozei. Se pot crea cromozomi artificiali pentru diferite organisme, precum tomatele, sau pentru introducerea de material genetic în celule pentru corecția leziunilor genetice, în cadrul terapiei genice. YAC-urile sunt utilizate cu mare eficiență în cartarea genomului multor organisme. Se pot construi biblioteci de YAC-uri utilizate în secvențiere, cunoscute sub numele de biblioteci de ADN. Prin clonarea unui număr mare de fragmente diferite de YAC-uri, se poate produce o bibliotecă de *elemente cromozomale contigui*, în care întreaga regiune a genomului sau a unui cromozom este reprezentată în fragmentele YAC care se suprapun.

Pentru transmiterea stabilă a unor secvențe lungi de ADN, reprezentând o genă de interes și suficient de mult material genetic flancator, spre a asigura o expresie completă a genei de interes, YAC reprezintă un vector ideal. Dar trebuie avut în vedere faptul de a evita introducerea de material genetic străin de specie în forma unor gene active, deoarece acesta poate induce rearanjamente cromozomale și altera funcționarea genelor gazdă, procese care pot induce și o creștere tumorală. Cel mai bine este să se introducă un cromozom artificial care conține părți esențiale pentru moștenirea stabilă a genei de interes. Acestea sunt următoarele: o origine a replicării, telomerele, centromerul și regiunea de flancare a genei de interes.

Cercetătorii de la Universitatea Cleveland și ai firmei Athersys Inc. conduși de Willard Huntington, au realizat în anul 1997 un cromozom sintetic uman, de cinci ori mai mic decât lungimea medie a cromozomilor umani. El poate fi folosit ca vector care să conducă la țintă o anumită genă, ceea ce va constitui un element esențial în terapia genică.

9. BIBLIOTECA ADN

O bibliotecă ADN reprezintă o colecție artificială de ADN de la un organism, aparținând unei specii date. ADN extras este fie clivat cu enzime de restricție sau împărțit și legat într-un vector de clonare (ADN capabil de replicare autonomă, fie în celule de drojdie, fie în celule bacteriene). Scopul este de a avea o singură piesă de ADN străin în fiecare vector, cu acoperire suficientă (*contig*-uri) astfel ca fiecare secvență a genomului unui organism să fie prezentă cel puțin o dată.

Cele mai importante tipuri de vectori de biblioteci ADN sunt.

1. YAC-uri (cromozomi artificiali de drojdie). Acestea pot păstra până la 2 Mb (milioane de baze) de ADN. Există biblioteci contigui complete de YAC pentru cromozomii umani Y și 21. Bibliotecile YAC sunt greu de menținut, fiind adesea instabile. Cel mai adesea, acestea sunt himerice, deoarece conțin două fragmente de ADN din zone diferite ale genomului.

2. Cosmidele sunt plasmide modificate care conțin unele secvențe din ADN bacteriofagic și secvențe de ADN plasmidic, cum ar fi cele care conțin informația genetică pentru rezistența la antibiotice (pentru scopuri de selecție). Asemenea vectori pot primi inserții de 35-45 kb. Există biblioteci cosmidice pentru cele mai multe regiuni ale genomului uman. Ele sunt cele mai utile pentru construirea regiunilor localizate de intinderi continui de ADN, de exemplu, când se cercetează pentru secvențe genice candidat.

3. Bacteriofagii au unele secvențe neesențiale în ADN, în mediul de laborator, putând fi inlocuite de ADN străin cu o lungime medie de 17 kb. De regulă se utilizează doar biblioteci parțiale sau pentru scopuri de subclonare. Mărimea secvenței pe care o adăpostesc este de regulă prea mică, pentru a se putea rezolva problemele de cartare (de exemplu „***chromosome walking***", „plimbarea cromozomilor" în regiuni de ADN repetitiv) . se pot realiza și biblioteci de ARN care sunt mai întâi reverstranscrise în ADN complementar. Acestea reprezintă secvențele din celulă care sunt realmente exprimate, fiind specifice tipului de țesut, respectiv de celulă.

CAPITOLUL IV

ORGANIZARE GENICĂ

1.GENE PARALOGE ȘI GENE ORTOLOGE

Pentru definirea acestor termeni este util să realizăm comparația dintre gene aflate în genomul vertebratelor precum sunt cele din superfamilia hormonului de creștere, dintre care gena hormonului de creștere și gena prolactinei sunt relevante, din acest punct de vedere. Acești hormoni diferă prin 65% din secvența lor de aminoacizi, dar au o lungime aproximativ egală, între 190 și 199 de aminoacizi, diferind de la o specie la alta. În anumite poziții analoge, se întâlnesc însă aceiași aminoacizi. Genele pentru acești doi hormoni prezintă patru introni, în esență cu aceiași localizare, dar dimensiunea acestora este foarte diferită, după cum și secvențele flancatoare 5' și 3' sunt foarte diferite. Fiecare genă este exprimată într-un tip diferit de celulă hipofizară și reglată de semnale distincte. Majoritatea vertebratelor au în genomul haploid doar o genă pentru prolactină și doar o genă pentru hormonul de creștere. Prolactina are funcție diferită la mamifere față de celelalte vertebrate. Mamiferele placentare au cel puțin încă un membru al acestei familii genice și anume gena pentru hormonul lactogen placentar. Gena hormonului de creștere și gena lactogenului placentar prezintă introni cu poziționare identică și au o omologie de secvență de 92%, la nivelul secvențelor codificatoare, din ADN, și de 85%, la nivelul secvenței de aminoacizi, din catenele polipeptidice. Omologie înaltă apare și la nivelul intronilor, precum și la nivelul a 500 perechi de baze, din regiunile flancatoare.

Aceste similitudini dintre cele două gene sunt interesante și prin faptul că, pe când hormonul de creștere este produs în hipofiza anterioară, lactogenul placentar este produs în placentă, astfel că expresia celor două gene cade sub un control diferit. Aceste gene sunt distant înrudite, de unde s-a dedus că forma ancestrală comună, din care ele au derivat, a suferit duplicație genică, înainte de divergența peștilor și a amfibienilor, de acum circa 400 milioane de ani (fig. 1). Cele două

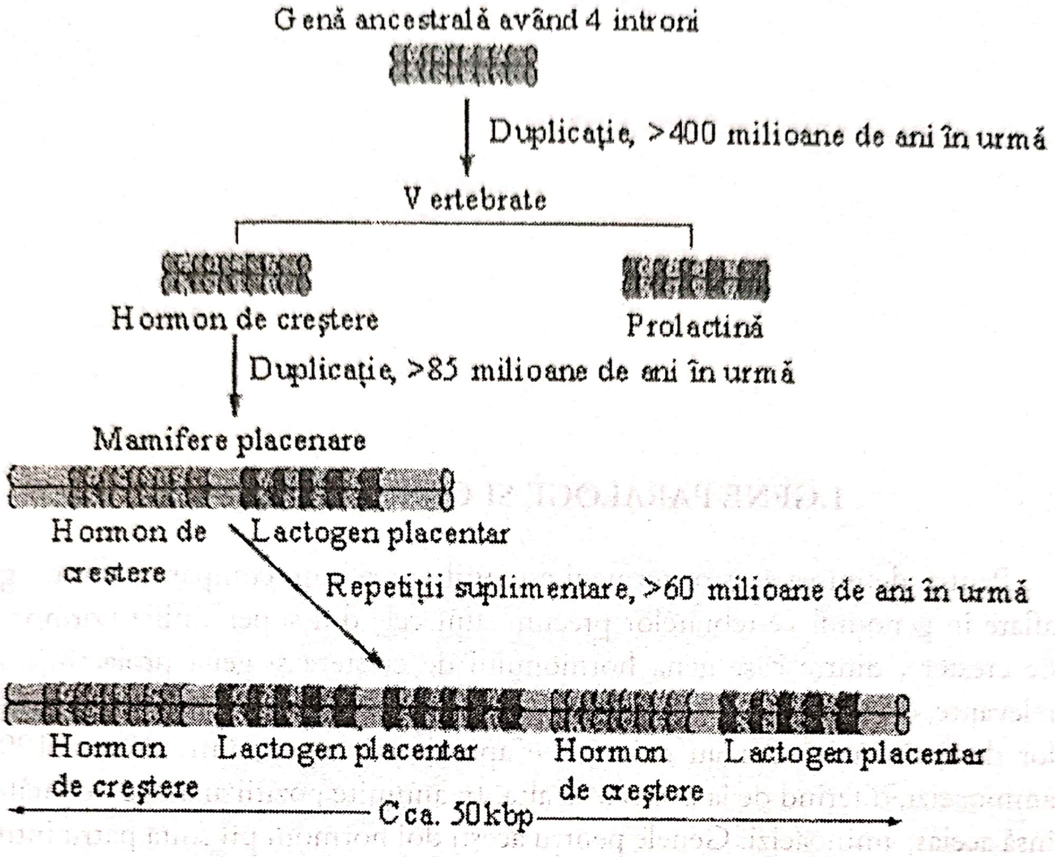

Genă ancestrală având 4 introni
Duplicație, >400 milioane de ani în urmă
Vertebrate
Hormon de creștere
Prolactină
Duplicație, >85 milioane de ani în urmă
Mamifere placenare
Hormon de creștere
Lactogen placentar
Repetiții suplimentare, >60 milioane de ani în urmă
Hormon de creștere
Lactogen placentar
Hormon de creștere
Lactogen placentar
Cca. 50kbp

Fig. 1 — Evoluția familiei multigenetice a hormonului uman de creștere (după Singer și Berg, 1991).

gene, deși înrudite, au evoluat independent, la cele două grupe de organisme. La om, gena prolactinei se află în cromozomul 6, pe când gena pentru hormonul de creștere se află în cromozomul 17.

Genele paraloge sunt gene înrudite din genomurile unor specii care aparțin aceluiași grup taxonomic de viețuitoare, gene care au derivat prin duplicație genică din aceeași genă ancestrală. Astfel, la toate mamiferele placentare există gena lactogenului placentar, înrudită îndeaproape cu gena hormonului de creștere, pe când alte clase de vertebrate nu conțin această genă. Explicația constă în aceea că o duplicație a genei pentru hormonul de creștere trebuie că a avut loc acum 85-100 milioane de ani, odată cu stabilirea celor mai multe linii evolutive de mamifere. Duplicatele rezultate au rămas împreună și și-au menținut lincajul, dar s-au diferențiat structural și funcțional, suferind divergența, devenind **gene paraloge**. În plus, primatele au numeroase gene lincate, atât pentru hormonul de creștere, cât și pentru lactogenul placentar. De exemplu, în cazul omului, în cromozomul 17 se află două gene pentru hormonul de creștere și trei gene pentru lactogenul placentar, ceea ce este o dovadă a faptului că au avut loc duplicații suplimentare, înainte de diferențierea liniei primatelor, acum circa 60 milioane de ani.

Genele ortologe sunt gene omoloage structural și funcțional, dar care aparțin unor specii diferite. Astfel, gena pentru hormonul de creștere de la găină, gena pentru hormonul de creștere de la bovine, gena pentru hormonul de creștere de la șobolan și gena pentru hormonul de creștere de la om sunt ortoloage. Ele au o omologie de secvență de 75%, și constituie **gene ortologe** tipice. Cu alte cuvinte, o anumită genă, responsabilă de sinteza unui anumit produs genic, cum ar fi hormonul de creștere, poate fi întâlnită la grupe diferite de organisme (găină și mamifere, de exemplu) sau la specii diferite, ce aparțin aceluiași grup (șobolan, bovine, om).

Procesul de repetiție a exonilor, precum și cel de amestecare sau mixare (**shuffling**) exonică au jucat un anumit rol în evoluția genei pentru hormonul

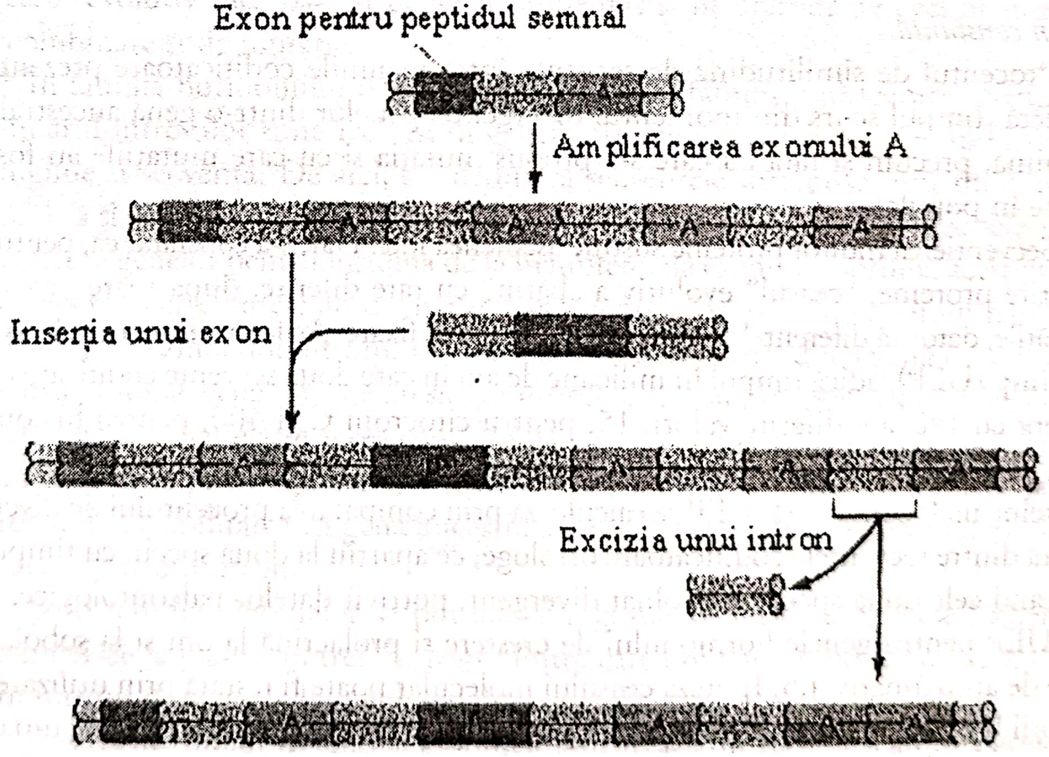


Fig. 2 — Model schematic care explică evoluția genelor pentru hormonul de creștere prin repetiția în tandem a unui exon ancestral, inserția unui exon și excizia unui intron (după Singer și Berg, 1991).

de creștere, ceea ce a condus la amplificarea exonică. La șobolan, gena hormonului de creștere are 5 exoni (fig. 2). Primul și o parte a celui de al doilea exon codifică secvența semnal a polipeptidului. Restul celui de al doilea exon, al patrulea și cel de al cincilea exon prezintă similitudini, ceea ce denotă că au rezultat printr-o amplificare de patru ori a unui exon ancestral (cel de al cincilea exon conține două copii ale regiunii de omologie). Exonul 3 nu este similar celorlalți și poate fi rezultatul **shuffling**-ului exonic, adică al inserției unui exon copiat dintr-o altă genă.

Deși peptidul codificat de exonul 3 are activitate antiinsulinică, el nu promovează creșterea, pe când hormonul de creștere, prin el însuși, prezintă ambele activități.

2. CEASURILE MOLECULARE ÎN EVOLUȚIA GENOMULUI

Această problemă este bine ilustrată de analiza comparativă a structurilor genice din superfamilia hormonului de creștere. Ipoteza fundamentală privind evoluția moleculară are la bază ideea că *mutațiile se acumulează cu o rată mai mult sau mai puțin constantă.*

Procentul de similitudine de secvență între regiunile codificatoare prezente reflectă timpul scurs din momentul divergenței genelor dintr-o genă ancestrală comună, precum și rata cu care s-a produs mutația și cu care mutațiile au fost fixate în populație.

Secvențierea multor proteine susține asemenea idei. Dar, s-a constatat că, pentru diferite proteine, „ceasul" evolutiv a „bătut" cu rate diferite, după toate probabilitățile, datorită diferențelor înregistrate în rata de fixare. Astfel, **unitatea evolutivă de timp** (UEP), adică timpul în milioane de ani în care două secvențe codificatoare diverg cu 1%, are diferite valori: 15, pentru citocrom C și 400, pentru histona H4, prima fiind o proteină moderat conservată, pe când cea de a doua este o proteină înalt conservată. UEP se calculează prin compararea procentului de divergență dintre secvențele codificatoare ortologe, ce aparțin la două specii, cu timpul de când cele două specii au evoluat divergent, potrivit datelor paleontologice.

UEP pentru genele hormonului de creștere și prolactină la om și la șobolan este de aproximativ 4,5. Ipoteza ceasului molecular poate fi testată prin utilizarea valorii UEP și compararea secvențelor genelor pentru hormonul de creștere uman și lactogenul placentar uman. Divergența este de aproximativ 10%, ceea ce dă o valoare de aproximativ 45 milioane de ani (10x4,5) pentru diversificarea care a condus la geneza genei lactogenului placentar. Acest rezultat este surprinzător, deoarece datele paleontologice plasează momentul divergenței masive în grupul mamiferelor, acum 85-100 milioane de ani. Explicația poate admite că aceeași duplicație a apărut independent în specii separate de mamifere sau că UEP pentru gena lactogenului placentar este diferită de aceea a genei hormonului de creștere uman. De reținut este constatarea că genele pentru hormonul de creștere sunt mult mai similare genelor pentru lactogenul placentar uman decât sunt ele în comparație cu genele ortologe pentru hormonul de creștere de la șobolan și bovine. În al doilea rând, intronii din genele umane pentru hormonul de creștere și lactogenul placentar sunt aproape tot atât de similari între ei, cum similare între ele sunt secvențele codificatoare. Dar cum este de așteptat, intronii analogi în genele paraloge au suferit divergență extinsă în lungime și secvență. Evident, evoluția celor două gene paraloge nu este independentă, ci ea este una concertantă, fenomen numit **omogenizare a structurii genice** și este întâlnit și în alte familii multigenice, precum sunt cele ale globinei și în secvențele repetate, dar dispersate.

Omogenizarea structurii genice într-o pereche de gene înrudite, dar distincte, s-a realizat prin crossing-over inegal, în cazul omogenizării genelor pentru ARNr, cel puțin în unele genomuri. O altă posibilitate presupune realizarea delețiilor recente în asemenea gene, urmată de noi amplificări, precum și conversia genică. Ceasul evolutiv încă bate și poate fi influențat și în prezent de evenimente de recombinare și de mutație.

În familia hormonului de creștere ca și în alte familii multigenice, poziția și numărul intronilor sunt aceleași în genele ortologe și paraloge, diferind însă ca lungime și secvență. De aici, s-a dedus că secvențele interpuse sunt tot atât de vechi ca și genele ancestrale comune, dar sunt relativ libere de presiunea selectivă. Structura genelor pentru insulină de la mamifere, de exemplu, sprijină acest punct de vedere. Vertebratele au o singură genă pentru insulină în genomul haploid, genă care prezintă doi introni. Dar, unele rozătoare au o a doua genă funcțională pentru insulină, genă care are un singur intron. Cea mai plauzibilă explicație pentru o asemenea situație este aceea care admite că această a doua genă pentru insulină a fost produsă prin duplicație, urmată de pierderea unui intron, fiind mai puțin probabilă posibilitatea ca gena ancestrală a insulinei pentru toate vertebratele să fi avut doar un intron.

Și în familia globinelor se pot aduce argumente similare. Genele leghemoglobinei de la plante au trei introni, dintre care doi corespund, ca poziție, celor doi introni din genele hemoglobinelor animale.

Poziția intronilor în familia globinelor ilustrează un alt fapt și anume acela că exonii codifică frecvent domenii structurale și funcționale distinctive ale proteinei funcționale. Toate aceste date conduc la ideea că intronii au fost prezenți în cele mai timpurii gene. Reacțiile de **self-splicing** pot reflecta mecanismele prin care genele timpurii au fost asamblate în unități funcționale.

Prezența de la început a intronilor în genele ancestrale nu exclude totuși posibilitatea ca unii introni să fi fost ulterior inserționați în regiuni codificatoare funcționale. Astfel, s-a sugerat că unii introni din familia genică care codifică serin-proteaze (de exemplu, trombina, tripsina, chimotripsina) reprezintă inserții. Există modele clare prin care se poate realiza inserția intronilor. Astfel, intronii de grup I și de grup II sunt inserționați în situsuri țintă, prin conversie genică sau prin reversia reacțiilor de **self-splicing**. Conversiile genice din grupul I de introni depind de proteine codificate de introni.

3. GENELE PENTRU ARNR 18S, 5,8S ȘI 28S

Spre deosebire de genele codificatoare de proteine, pentru care în cadrul procesului de transcriere rezultă produși genici multipli, prin traducerea repetată a aceleiași molecule de ARNm, pentru genele ribozomale și genele ARN de transfer, produsul genic functional este singular, deoarece fiecare rundă de transcripție genică produce doar câte o singură copie a transcriptului, respectiv o singură copie a produsului ARNr sau ARNt final. Aceasta presupune ca necesarul de numeroase molecule de ARNr sau ARNt de care celula are nevoie să se asigure prin repetitivitatea genelor la nivelul genomului, de unde derivă existența unui număr mare de gene redundante pentru cele două categorii de ARN celular.

Segmentul de ADN care poartă informația genetică pentru diferitele specii de ARNr poartă denumirea de ADNr. Acest ADNr are un bogat conținut în G+C, mai bogat decât al genomului ca întreg, la multe specii de viețuitoare, copii numeroase de ADNr fiind repetate în tandem, în șiruri lungi, ceea ce face ca densitatea de plutire să fie relativ mare, în comparație cu restul ADN genomic, putând fi izolat prin ultracentrifugare izopicnică. La eucariote, genele sau cistronii ribozomali sunt localizați în regiunea organizator nucleolară (NOR) a cromozomului organizator nucleolar, acolo unde se organizează nucleolul, prin apoziția produșilor de transcripție (ARNr) peste matrița lor (ADNr). La nivelul nucleolilor are loc și procesarea transcriptelor primare ARNr, adică a precursorilor ARNr, din care rezultă diferitele specii de ARNr: 18S, 5,8S și 28/25S.

Spre deosebire de genele pentru ARNr, aflate în număr de sute sau mii (tabel 1), la majoritatea eucariotelor, genele pentru proteinele ribozomale se află într-un număr redus de copii, între 1 și 10 copii per genom, întâlnindu-se și pseudogene procesate pentru asemenea proteine ribozomale.

Tabel nr.1 Localizarea, numărul de copii și dimensiunea genelor (cistroni) ribozomale.

Specia	Localizarea în cromozomul:	Număr aproximativ de copii/genom haploid	Dimensiunea aproximativă a unității de transcripție în Kb
Caenorhabditis elegans (nematod)	1	55	6
Dictyostellum discoideum (ciupercă)	-	-	42
Saccharomyces cerevisiae (drojdie)	12	100	7
Tetrahymena pyriformis (ciliat)	-	1	-
Drosophila melanogaster (insectă)	x,y	200	8
Xenopus laevis (amfibian)	o localizare cromozomală	600	8
Gallus domesticus (pasăre)		200	10,5
Mus musculus (mamifer)	15,18,19,12,16,18	100	13
Homo sapiens (primat)	13,14,15,21,22	150-120	14
Zea mays (graminee)	6	3000-9000	14

Genele pentru cele trei specii de ARNr-ARNr 18S, ARNr 5,8S și ARNr 25/28S (la plante, respectiv la animale) sunt strâns lincate și localizate într-o singură unitate transcripțională, dispuse în ordinea de mai sus, fiind transcrise împreună de către ARN-polimeraza I. Procesarea ulterioară a transcriptului primar eliberează cele trei specii de ARNr matur, funcționale în edificarea subunităților ribozomale. Prelucrările posttranscripționale includ clivaje endonucleolitice și metilări ale bazelor, precum și ale grupelor 2'-OH. Unitatea integrală de transcripție include două segmente spațiatoare de ADN necodificator numite *spațiatori interni transcriși*, desemnați **ITS**. Aceștia separă cele trei regiuni codificatoare, una de cealaltă. Și regiunile necodificatoare care preced prima genă (pentru ARN 18S) și urmează după ultima genă (pentru ARNr 28/25S) sunt separate prin spațiatori care se numesc *spațiatori externi transcriși*, desemnați **ETS**.

Lungimea și secvența celor trei specii de ARNr diferă foarte puțin de la o specie la alta, astfel că diferențele remarcate între unitățile de transcripție la diferitele specii (tabelul 1) reflectă diferența în dimensiune a regiunilor spațiatoare care variază de la o specie la alta. Segmentele de ADN de pe ambele laturi ale situsului de start transcripțional, de la capătul 5' al ETS, sunt esențiale pentru transcripția realizată de ARN-polimeraza I. Aceste secvențe sunt foarte diferite de la o specie la alta, ceea ce vine în contrast cu gradul înalt de similitudine dintre regiunile codificatoare. Aceste diferențe sunt determinate probabil de specificitatea de specie a transcripției cu ARN polimeraza I, care pare a necesita interacțiuni dintre aceste secvențe și factorii de transcripție accesorii, specifici fiecărei specii.

Șiruri de clusteri de unități genice ribozomale, dispuse în tandem direct, apar la unele specii, în mai mulți cromozomi diferiți. Unitățile de transcripție ale ADNr în cadrul acestor clusteri sunt separate de *segmente spațiatoare intergenice* numite **IGS** (fig. 3).

Lungimea IGS-urilor variază de la 2 Kb, la drojdii, la 30 Kb, la mamifere, fiind variabilă, ca urmare, și lungimea generală a unității repetitive, incluzând unitatea de transcripție plus IGS. Și secvența din intronul IGS variază de la o specie la alta.

Numărul de copii de unități repetitive de ADNr variază de la un individ la altul al aceleiași specii. În genomul uman, în care unitățile de ADNr sunt localizate în cinci perechi diferite de cromozomi, fiecare locus genic ribozomal conține un număr diferit de unități ADNr și numărul acestor loci genici din fiecare cromozom variază de la un individ la altul. La unele organisme, numărul de copii ADNr este variabil, chiar în cadrul aceluiași organism, în diferitele sale țesuturi, în cursul vieții individuale. Astfel, expansiunea și restrângerea numărului de copii genice ribozomale este o proprietate obișnuită pentru ADNr. Asemenea comportament dinamic al genomului este consecința procesului de recombinare genetică omoloagă, dar inegală, dintre repetițiile în tandem nealelice. Acestea explică modificarea numărului de copii ADNr.

În cazul genomului uman se realizează o veritabilă interacțiune între unitățile repetitive ADNr, precum și o comunicare intercromozomală (Lima-de-Faria, 1983)

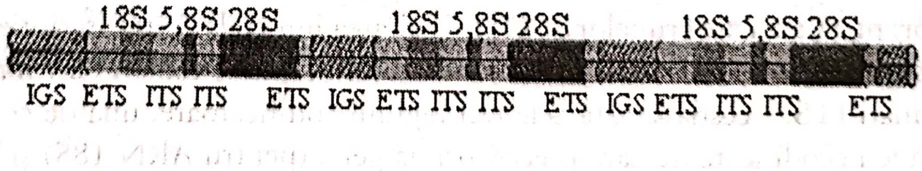


Fig. 3 — Organizarea genelor pentru ADNr. Unitățile transcripționale sunt grupate specific în tandem. Sunt reprezentate regiunile codificatoare pentru ARNr 18S, 5,8S și 28S, precum și cele trei tipuri de spațiatori (spaceri): spațiatorul (spacer-ul) extern transcris (**ETS**), spațiatorul intern transcris (**ITS**) și spațiatorul intergenic (**IGS**), (după Singer și Berg, 1991).

între diferiții cromozomi organizatori nucleolari. Secvențele de nucleotide ale tuturor unităților ADNr uman, sunt surprinzător de similare, chiar dacă clusterii lor, dispuși în tandem, sunt situați în cromozomi diferiți. Dacă unitățile de ADNr din fiecare cromozom ar fi fost izolate unele față de altele, ele ar fi trebuit să dobândească diferite mutații, în mod randomizat. Cu timpul, ele ar fi trebuit să fie din ce în ce mai diferite, în special la nivelul regiunilor relativ lipsite de importanță, ale IGS-urilor. Uniformitatea unităților ADNr uman vorbește de la sine despre existența unei anumite interacțiuni/comunicări dintre ele. Trebuie să luăm în considerație, pe lângă asemenea posibilă interacțiune, și faptul că, asemănător mutațiilor din genele pentru ARNt și aminoacil-sintetaze, și mutațiile din genele ribozomale intră în categoria „interzisă“: fiind esențiale în precizia decodificării informației genetice și pentru viața celulei, asemenea mutații au fost eliminate de selecția naturală, având efect letal asupra indivizilor purtători.

Recombinarea omoloagă inegală dintre unitățile ADNr, din diferiții cromozomi, ca și între unitățile nonalelice din cromatidele surori, ar putea așeza toate copiile rezultate într-o rețea comună, ceea ce ar explica similitudinea dintre toate secvențele ADNr. Totodată, acestea ar explica schimbarea numărului de copii, la nivelul clusterilor cromozomilor individuali.

Structura IGS-urilor este complexă și diferă de la o specie la alta, atât ca secvență cât și ca organizare, ceea ce contrastează clar cu regiunile codificatoare din ADNr care sunt înalt conservate. O particularitate întâlnită adesea la IGS-uri este aceea a existenței clusterilor de repetiții directe în tandem, deși secvențele repetate sunt diferite, la diferite organisme. Cu excepția mamiferelor, unitățile repetitive sunt frecvent similare secvențelor din jurul situsurilor start de transcripție și, prin aceasta, pentru semnalele promotor pentru ARN polimeraza I. Unele dintre aceste secvențe repetate servesc ca situsuri start transcripționale minore și de aici rezultă prezența unui nivel redus de ARN omolog IGS, la unele specii. Alte asemenea secvențe conțin enhanceri ai expresiei ADNr.

Prezența ubicvitară a repetițiilor în tandem, în cadrul IGS-urilor, sugerează că prezența lor, nu însă și secvența lor specifică, este legată de unele efecte avantajoase asupra transcripției ADNr.

Crossing-overul inegal dintre unitățile repetitive în tandem, din cadrul IGS-urilor, generează un număr diferit de unități repetitive, exact cum se realizează și numere diferite de unități complete de ADNr. Astfel, IGS a evoluat deopotrivă concertant cu, și independent de, unitatea lungă a ADNr, în care este inclus. Ca urmare a crossing-overului inegal, lungimea generală a unităților repetitive ADNr variază la specii strâns înrudite și chiar în cadrul aceleiași specii.

4. GENELE PENTRU ARNr 5S

Aceste gene nu sunt, de regulă, lincate cu genele pentru ARNr 18S, 5,8S și 25/28S, cu excepția unor fungi și protozoare. Genele pentru ARNr 5S sunt transcrise de ARN-polimeraza III, iar porțiuni din secvențele codificatoare interne funcționează ca elemente de control în transcripție. Genele pentru ARNr 5S nu au structură mozaicată, secvența codificatoare nefiind întreruptă de introni. Lungimea moleculei de ARNr 5S este aceeași, de la bacterii la om, și are 120 ribonucleotide. Genele pentru ARNr 5S de la multe specii de eucariote sunt repetate de numeroase ori, în șiruri lungi, în tandem, așa cum rezultă din tabelul 2:

Tabel 2. Genele ARNt 5S

Specia	**Localizarea cromozomală**	**Numărul aproximativ de copii/genom haploid**	**Lungimea aproximativă a unității repetitive incluzând IGS (pb)**
Saccharomyces cerevisiae	12	150	-
Drosophila melanogaster	2Rbanda 56EF	160	375±5
Xenopus laevis	multe sau toate cu localizare telomerică	400 în celule somatice 20.000 în ovocite	850-900 600-1000
X. borealis	-	700 în celule somatice 9000 în ovocite	850-900 1000-200
Homo sapiens	1	2000	-

ADNr 5S apare ca o bandă distinctă, în centrifugarea izopicnică, chiar dacă el reprezintă doar 1% din genom. Regiuni bogate AT alternează cu regiuni bogate în GC. Regiunea codificatoare lungă de 120 de baze reprezintă porțiunea bogată în GC și reprezintă mai puțin de 20% din lungimea totală a repetiției. Restul este un spațiator netranscris, bogat în AT. Există gene variante pentru ARNr 5S, fapt dedus după heterogenitatea ADNr 5S din centrifugarea în gradientul de densitate și curba de topire multicomponentă.

La *Drosophila melanogaster* cele aproximativ 160 de gene pentru ARNr 5S sunt repetate în tandem, într-o regiune a cromozomului 2. Fiecare unitate de repetiție conține regiunea codificatoare lungă de 120 perechi de baze, aproximativ 15 perechi de baze de spațiator transcris la capătul 3' al unității de transcripție și aproximativ 250 perechi de baze al spațiatorului netranscris (fig. 4). Toate cele 160 de unități

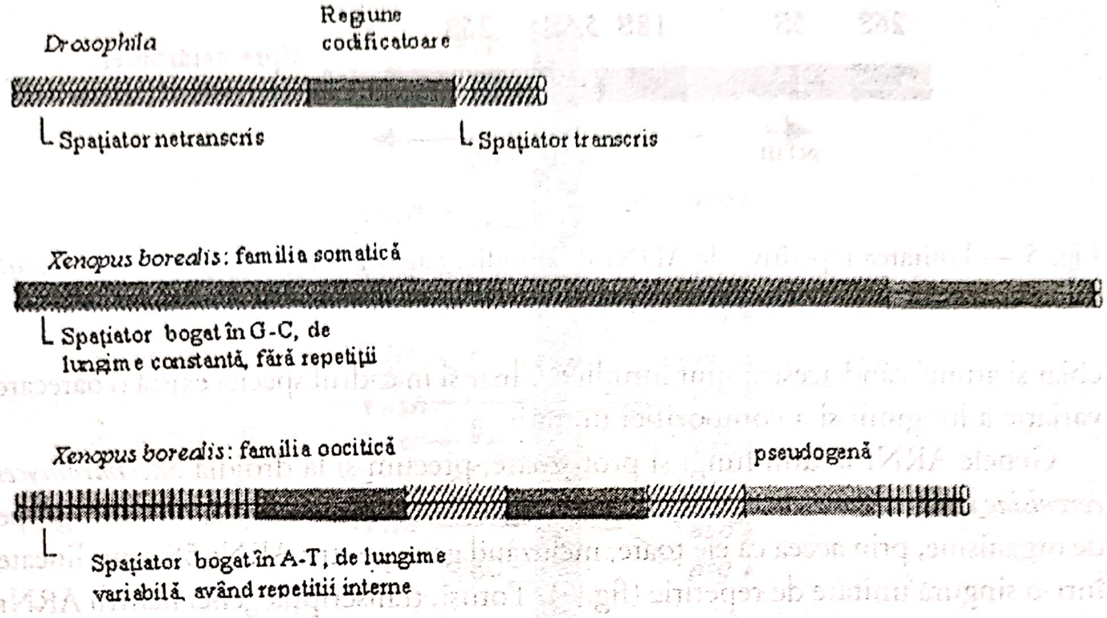

Drosophila
Regiune codificatoare
Spaţiator netranscris
Spaţiator transcris
Xenopus borealis: familia somatică
Spaţiator bogat în G-C, de lungime constantă, fără repetiţii
Xenopus borealis: familia oocitică
pseudogenă
Spaţiator bogat în A-T, de lungime variabilă, având repetiţii interne

Fig. 4 — Structura unor unităţi repetitive de ADNr 5S. În cadrul unităţilor, segmentele spaţiatoare (spaceri) pot alterna cu una sau mai multe gene sau pseudogene. În ADNr 5S din ovocitul de *X. borealis*, unităţile repetitive conţin un număr variabil de gene şi pseudogene, separate una de alta de aproximativ 80 pb ce aparţin spaţiatorului. Aceste unităţi sunt separate prin spaţiatori lungi, bogaţi în A-T, de lungime variabilă şi având repetiţii interne. Aceşti spaţiatori conţin multiple repetiţii în tandem, alcătuite din unităţi de 21pb (5'-CGTCGCGTCGTTTTTGTCGCG-3') şi îşi modifică lungimea prin modificarea numărului de copii ale segmentului repetat. Clivarea ADNr 5S cu enzima de restricţie HhaI (situsul de recunoaştere este GCGC) uşurează analiza structurii prin producerea unor segmente care conţin unităţi repetitive de 21pb (după Singer şi Berg, 1991).

repetitive apar a fi situate într-un singur cluster, neîntrerupt de alte secvenţe. Peste 20 de repetiţii în tandem au fost clonate într-un singur segment de peste 8 perechi de kilobaze lungime. Regiunea bogată în AT din spaţiator are repetiţii ale secvenţei interne şi este variabilă în lungime (±5 perechi de baze).

Speciile de *Xenopus*, ca şi peştii, au două familii de gene pentru ARNr 5S: una cuprinzând mii de copii genice, care sunt exprimate în ovogeneză şi alta care cuprinde un număr mai mic de copii genice, fiind exprimată deopotrivă în ovocite şi în celulele somatice, în cele mai multe stadii de dezvoltare. Fiecare dintre aceste două familii are o secvenţă codificatoare distinctă, dar în cadrul fiecărei familii, secvenţele codificatoare sunt omogene. Ambele familii sunt aranjate în repetiţii în tandem. Unitatea de repetiţie a genelor somatice pentru ARNr 5S este simplă. Regiunea spaţiatoare lungă alternează cu unitatea scurtă de transcripţie. Unităţile repetitive 5S din ovocit sunt însă complicate şi au forme diferite, la diferitele specii,

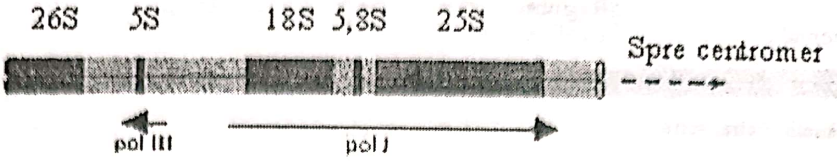


Fig. 5 — Unitatea repetitivă de ADNr de drojdie. Săgeata lungă și săgeata scurtă arată direcția de realizare a transcrierii (după Singer și Berg, 1991).

chiar și atunci când acestea sunt înrudite. Chiar și în cadrul speciei există o oarecare variație a lungimii și a compoziției unității.

Genele ARNr la unii fungi și protozoare, precum și la drojdia *Saccharomyces cerevisiae* sunt diferite ca organizare, față de genele corespunzătoare, de la alte grupe de organisme, prin aceea că ele toate, incluzând gena pentru ARNr 5S, sunt lincate într-o singură unitate de repetiție (fig. 5). Totuși, transcripția genei pentru ARNr 5S se face pe catena ADN opusă aceleia utilizată ca matriță pentru sinteza precursorului, care cuprinde moleculele 18S, 5,8S și 25S. Cele două unități de transcripție distincte utilizează ARN polimeraze diferite, ARN polimeraza I, pentru transcriptul policistronic lung și ARN polimeraza III, pentru ARNr 5S.

La drojdia *Schizosaccharomyces pombe* și la ciuperca *Neurosporacrassa*, genele pentru ARNr 5S sunt dispersate în tot genomul. Prin experiențe genetice s-a stabilit cartarea celor mai multe, dacă nu a tuturor unităților repetitive de ADNr, de la *S. cerevisiae* într-un singur cluster în tandem, situat în cromozomul 12. Cartarea regiunii este următoarea:

-URA4-ARNr-PEP3-GAL2-ASP5-centromer.

5.GENELE PENTRU ARNt

Genele pentru ARNt, ca și acelea pentru ARNr 5S, sunt transcrise de ARN polimeraza III, iar secvențele promotorului sunt asemănător localizate intern, în cadrul secvenței codificatoare. Unele gene ARNt au introni, altele nu au introni. Chiar și la aceeași specie, precum drojdia de bere (*Saccharomyces cerevisiae*), *Drosophila* și *Xenopus* există unele gene ARNt cu introni. De regulă, intronii din genele ARNt sunt scurți, de 45 de perechi de baze sau mai puțin și apar exact în partea 3' a nucleotidelor care codifică regiunea anticodonului. Și genele ARNt sunt prezente în copii multiple, în genomul eucariot. Ele nu sunt dispuse, însă, atât de ordonat, cum sunt dispuse genele ribozomale, putând fi sau nu, una în imediata vecinătate a alteia.

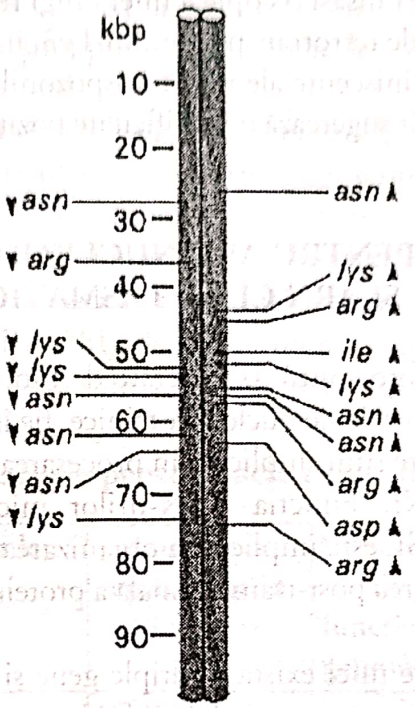


Fig. 6 — Anatomia unui cluster de gene pentru ARNt din regiunea cromozomală 42A de la *Drosophila*. Săgețile indică direcția de realizare a transcrierii (după Singer și Berg, 1991).

Genele multiple pentru un singur tip de ARNt pot fi sau pot să nu fie grupate. De exemplu, reasocierea probelor de ARNt cu cromozomii de *Drosophila*, in situ, evidențiază aproximativ 50 de loci diferiți, în care multe gene sunt grupate. Locii individuali conțin gene pentru un amestec de diferite ARNt-uri (fig. 6). Unele gene pentru același ARNt apar în repetiții în tandem. Cu alte cuvinte, în cazul genelor pentru ARNt se remarcă toate aranjamentele posibile.

La drosofilă, drojdii și la alte organisme, în cadrul secvenței de 100 de perechi de baze care precede genele pentru ARNt, apare adesea, secvența 5'-ACT (A sau T)$_n$TA, în care n variază de la 0 la 5. În genomul de drojdie, apare o secvență lungă de 340 perechi de baze, numită secvență *sigma*, repetată de 30 de ori, de fiecare dată printre cele 18 perechi de baze ale secvenței start a genei ARNt. Orientarea secvenței *sigma* față de direcția de transcripție a genei ARNt este în ambele direcții posibile. Totuși, cele mai multe gene pentru ARNt de drojdie nu se asociază cu secvența *sigma*, neexistând diferențe fenotipice între alela pentru ARNt cu secvența *sigma* și aceea lipsită de o asemenea secvență.

Secvența *sigma* este ea însăși o copie a unei lungi repetiții terminale (LTR) ce se află la ambele capete ale retrotranspozonului Ty3, întâlnit la drojdii. Asemenea LTR-uri „*solo*" sunt reminiscențe ale retrotranspozonilor. Localizarea lui *sigma* în fața genelor pentru ARNt sugerează o specificitate pozițională pentru inserția Ty3.

6.GENELE PENTRU ARN NUCLEAR MIC (*snRNA*) ȘI ARN CITOPLASMATIC

Toate celulele eucariote conțin o varietate de molecule ARN mici și stabile, multe fiind localizate în particule nucleoproteinice, fie în nucleu, fie în citoplasmă. Unele dintre cele nucleare sunt implicate în procesarea transcriptelor primare, fie preARNm, fie preARNr. Funcția ARN-urilor mici citoplasmatice nu este cunoscută, doar ARN 7SL este implicat în organizarea particulei de recunoaștere a semnalului, din procesarea post-translațională a proteinelor, el având aproximativ 300 nucleotide.

Pentru ARN nucleare mici există multiple gene și pseudogene. Genomurile metazoarelor conțin numeroase segmente ADN care reasociază cu ARNsn U1, U2, U3, U4, U5, U6 și U7 sau cu cADN realizat pe matrița acestor molecule. Genele funcționale pentru aceste clase de ARN sunt grupate (**clusteri**), pe când pseudogenele lor sunt dispersate. Regiunile flancatoare ale genelor conțin elemente reglatoare ale transcripției. Pseudogenele au suferit divergență prin deleții extinse, inserții sau schimbări de câte o singură pereche de baze și au secvențe flancatoare înalt divergente. Nu au fost studiate genele pentru tipurile mai puțin abundente de ARNsn, cum este, de exemplu, U11. Drojdiile au doar câte o copie genică, pentru fiecare tip de ARNsn și nu prezintă pseudogene. ARNsn de la metazoare, ca și cele de la drojdie, intervin în procesarea transcriptelor primare.

La multe specii, printre care și specia umană, se remarcă o compexitate enormă a familiilor de secvențe genice pentru ARNsn. Astfel, în ADN uman, familia U1 de gene pentru ARNsn cuprinde 30 de copii, dispuse într-un șir în tandem, în brațul scurt al cromozomului 1. Fiecare genă funcțională din cadrul șirului este inclusă într-o unitate de repetiție de cel puțin 44.000 perechi de baze (40 Kbp) lungime, iar pseudogenele apar de zece ori mai frecvent și în loci genomici diferiți.

La *Xenopus* sunt 500 de copii genice ARNsn U1, la șoarece 10, la găină 5, la drosofilă 3-4, iar la fasole (*Phaseolus vulgaris*), 1-2. Lungimea acestui tip de ARN este de 164 de ribonucleotide. ARNsn U2 are o lungime de 188-189 de ribonucleotide și genele pentru acesta se află în număr de 20-40 de copii, la om, 10, la șoarece, 500, la *Xenopus* și arici de mare și 5, la drosofilă. U3 este identificat în nucleolul tuturor metazoarelor și are o lungime de 216 ribonucleotide. Cel mai mic ARNsn este desemnat U7 și are 58 de ribonucleotide, fiind identificat la ariciul de mare. ARNsn 4,5S1 a fost identificat la rozătoare, are 98-99 ribonucleotide și genele sale sunt prezente în număr de 10^4 copii, la șobolan acestea fiind dispersate în tot genomul.

ARN-urile citoplasmatice mici sunt desemnate scARN. Tipul 7SL ARN este constituentul crucial a particulei de recunoaștere al semnalului care funcționează în translocarea polipeptidelor nou sintetizate, secretate și membranare, de-a lungul bistratului lipidic al reticulului endoplasmic. Secvența de nucleotide a ARN 7 SL, de la rozătoare și primate, este virtual identică, iar aceea de la *Drosophila*, prezintă o omologie de 64%, cu ARN 7SL, de la mamifere. În genomul uman există trei gene pentru ARN 7SL și câteva sute de pseudogene, așa cum rezultă din tabelul 3 (după Singer și Berg, 1991).

Tabel 3. Genele pentru unele tipuri de ARNsc

ARN	Identificat la:	Lungimea aproximativă (în baze)	Număr de copii de gene funcționale per genom haploid	ARN polimeraza
7SL	nevertebrate, vertebrate și drojdii	300 254	3-4 (om) 2 (*Drosophila*)	III
			1 (*Saccharomyces pombe*)	III
7SK	vertebrate	330	≤10 (om)	III
4,5S	rozătoare	90-94	850 (șoarece) 690 (șobolan)	III

Există însă, în plus, aproximativ 10^6 repetiții de secvență, împrăștiate în genom și care sunt omoloage la aproximativ jumătate din secvența ARN 7SL. Jumătatea care este atât de abundent repetată este o combinație a capătului 5' și a capătului 3', cu porțiunea centrală deletată, și se numește **secvența Alu**. O situație similară apare la rozătoare.

Nu se cunoaște care este funcția specifică a niciunuia dintre ARNsc, dar majoritatea se asociază la mamifere cu familii de secvențe care conțin deopotrivă gene și pseudogene.

7. GENELE CODIFICATOARE DE POLIPEPTIDE

Aceste gene au structură mozaicată: regiunile codificatoare (exonii) sunt întrerupte de unul sau mai mulți introni. Unele gene eucariote nu au introni (genele pentru histone și genele pentru cele mai multe tipuri de interferoni). Numărul intronilor este foarte variabil de la o genă la alta. Procentul de ADN genomic de la nivelul intronilor excede, de regulă, pe acela de la nivelul exonilor, uneori de ordinul a zeci de ori. În general, exonii analogi, ce aparțin la gene paraloge, din cadrul unui anumit genom sau la gene ortologe, din genomurile diferitelor specii, sunt mult mai conservatori în secvența de nucleotide, decât sunt intronii. Doar poziția intronilor este, la rândul ei, înalt conservată, pe când lungimea și secvența lor sunt variabile.

Toate genele codificatoare de polipeptide sunt transcrise de ARN polimeraza II, prezentând elemente similare ale promotorului și semnale de poliadenilare similare. Multe gene pentru polipeptide se asociază cu mai multe secvențe reglatoare specifice care modulează expresia genelor, ca răspuns la condiții de dezvoltare, hormonale și de mediu. De regulă, genele codificatoare de polipeptide specifice sunt reprezentate o singură dată în genom. Dar, genele în copie unică pot fi adesea membre ale unei familii de secvențe strâns înrudite, așa cum este cazul familiei genice pentru hormonul de creștere. Membrii familiei pot include mai multe gene care codifică pentru proteine ușor variante, așa cum sunt isozimele.

Există și situația în care membrii familiei de gene pot fi asociați cu diferite semnale reglatoare, spre a permite expresia în diferite țesuturi sau în momente diferite în cursul dezvoltării, precum genele pentru hormonul de creștere și lactogenul placentar. Unii membrii ai familiei genice pot fi pseudogene. Convențional, se consideră că două gene nealelice sunt considerate identice, numai atunci când codifică polipeptide virtual identice și sunt supuse aceleiași reglări și modulări. Dar, dacă sunt sau nu identice, genele strâns înrudite sunt considerate membrii unei familii multigenice, așa cum rezultă din tabelul 4 (Singer și Berg, 1991):

Tabelul 4: Unele familii de gene și proteine înrudite

A.Homoloage apropiate ca structură și funcție

β-globine
α-globine
actine
tubuline
zeine
hormon de creștere/lactogen placentar
receptori steroizi
opsine

B.Înrudite, dar divergente ca structură și funcție

α-globine/β-globine

prolactina/hormon de creștere
serum albumina/α-fetoproteina
interferon α/interferon β
ARN polimeraza

C.Rude îndepărtate

haptoglobina/proteaze serice (chemotripsina)
antitrombina III/ovalbumina/angiotensinogen
ceruloplasmina/factorul V/factorul VIII

Genele în copie unică pot, de asemenea, să aparțină unei familii de secvențe îndepărtat înrudite și ele pot codifica polipeptide foarte diferite, deși similitudinea în structura genică este marcantă, așa cum este cazul genei pentru hormonul de creștere și al genei prolactinei.

Clasificarea genelor individuale în superfamilii nu este totdeauna certă, deoarece membrii acestor familii prezintă un gradient de similitudine în secvența nucleotidică de la peste 95%, la sub 50%. Similitudinea dintre două proteine nu este doar o simplă funcție de procent de similitudine dintre genele care le codifică, având în vedere degenerarea codului genetic și caracterul **wobble** al împerecherilor codon-anticodon, din poziția a treia a codonilor. Schimbările din prima și a doua poziție se asociază însă cu schimbări radicale în structura polipeptidică.

Unele familii multigenice pentru polipeptide sunt redate în tabelul 5:

Tabel 5 Familii multigenice pentru polipeptide

Familia genică	Organism	Numărul de gene	Lincate (l) sau dispersate (d)	Caracteristici
Fosfataza acidă	drojdie	=4	l, d	Genele individuale sunt reglate pe căi diferite (una este represată de Pi, alta este constitutivă)
α-amilaza	șoarece șobolan orz	=3 =9 =7	l ? ?	Gene multiple exprimate în pancreas, una în ficat și glande salivare. Linii diferite de șoareci au numere variabile de gene α-amilazice în pancreas. 4 codifică amilaza pancreatică Cel puțin 3 gene funcționale
Colagen (interstițial)	om	4	d	Colagen interstițial, tipurile I (heterotrimer), II și III (homotrimeri) codificate de patru gene dispersate in cromozomii 2, 7, 12 și 17
Catena grea a miozinei	șobolan	=10	?	Cel puțin câte o genă pentru fiecare tip de mușchi și cel puțin o genă nemusculară
Ovalbumina	găină	3	l	Toate 3 reglate de estrogeni
Serumalbumina	șoarece	2	l	Albumina serică și α-fetoproteina
Vitelogenina	broască	4	?	Perechi de gene care diverg cu 20%; toate exprimate
Subunitatea mică a ribulozo-1,5-bifosfat carboxilaza	tomate	5	l, d	Exprimate în diferite țesuturi, în diferite stadii de dezvoltare, dependent de lumină
Zeina	porumb	100	d, l	Codifică o familie a proteinelor de rezervă din cariopsă

Deși multe gene aparțin familiilor multigenice sau multisecvențe și superfamiliilor, unele sunt probabil secvențe realmente unice, în anumite genomuri, așa cum este cazul genei tiroglobulinei umane și genei actinei de drojdie.

Fiecare familie multigenică ce codifică polipeptide este distinctă, cu trăsături variabile de la o specie la alta, așa cum rezultă din tabelul 5.

8. GENELE PENTRU ACTINĂ

Genele pentru actină constituie o familie multigenică conservată în cursul evoluției.

Actina este implicată în diferite tipuri de mișcări celulare, incluzând motilitatea intracelulară și contracția musculară. Eucariotele conțin numeroase și diferite tipuri de actină și, în consecință, gene numeroase și distincte pentru actine, așa cum rezultă din tabelul 6:

Tabelul 6. Genele pentru actină (din Singer și Berg, 1991)

Organismul	Numărul de proteine cunoscute	Numărul de gene inclusiv pseudogene	Lincate (l) sau dispersate (d)	Tipul de actină: m=mușchi c=citoplasmă
Saccharomyces cerevisiae	1	1	-	c
Dicyostelium (mucegai)	>2	17	l, d	c
Caenorhabditis elegans (nematod)		4	l, d	c
Oxytricha (ciliat)	>2	3		c
Soia		=2		c
Drosophila	3	6	d	c
Strongylocentrotus purpuratus (arici de mare)		8	l, d	m, c
Găină	6	8-10	d	m, c
Șobolan	6	=8	d	m, c
Om	6	20-30	d	m, c

Singura specie la care a fost identificată o singură genă pentru actină este drojdia de bere, *S. cerevisiae*.

Actinele citoplasmatice sunt implicate în motilitatea celulară. Ele sunt similare, la toate eucariotele și în această clasă intră toate actinele nevertebratelor și plantelor. La *Drosophila* precum și la alte nevertebrate, anumite actine citoplasmatice funcționează și în contracția musculară.

La vertebrate, α-actinele sunt implicate în contracția musculară. La păsări și mamifere sunt șase tipuri de proteine actinice. Două α-actine se întâlnesc în mușchii scheletici și cardiaci, fiind implicate în contracția musculară. Două actine, una de tip α și alta de tip γ, apar în mușchii netezi. Citoplasma tuturor mamiferelor și păsărilor conține actina citoplasmatică β și actina citoplasmatică γ.

Deși numeroase tipuri de actine sunt structural distincte, ele au secvențe foarte asemănătoare de aminoacizi, prezentând diferențe mai ales la nivelul terminalului NH_2. De exemplu, actinele umane β și γ diferă prin patru aminoacizi. Diferitele gene pentru actine constituie familii multigenice, la majoritatea speciilor, și regiunile lor codificatoare sunt omoloage, de la un organism la altul. De exemplu, α-actina din mușchiul scheletic are aceeași secvență de aminoacizi la găină și la mamifere, iar ARNm pentru actină, izolat din mucegaiul *Dictyostellum*, este o probă foarte bună pentru selecția clonelor genice pentru actină din ADN de drojdie, porumb, soia și mamifere.

Regiunile flancatoare 5' și 3' ale diferitelor gene pentru actine au suferit o divergență mai mare decât regiunile codificatoare. Totuși, genele echivalente pentru actină, precum cele ale β-actinei de la mamifere, au tendința de a avea regiuni flancatoare similare, la diferitele specii, fiind clar diferite de regiunile flancatoare ale genelor pentru α-actină, la aceeași specie.

În mod frecvent, regiunile flancatoare ale multor tipuri de gene pentru actină sunt atât de distincte, încât pot fi utilizate ca probe de hibridizare spre a se identifica un tip specific de genă și transcriptele sale. De exemplu, probe clonate, ce reprezintă fiecare secvențele remorcă 3', din cele șase gene diferite funcțional, de la ariciul de mare, pot fi utilizate pentru măsurarea transcripției diferențiate a genelor respective, în cursul dezvoltării embrionare și diferențierii. Astfel, deși toate regiunile codificatoare pentru actină și actinele sunt foarte înrudite, fiecare tip de actină apare a fi asociat cu secvențe necodificatoare caracteristice, secvențe ce au cu mare probabilitate, funcție reglatoare. Procesul evolutiv trebuie astfel considerat din două unghiuri clare: cel al proprietăților funcționale ale produsului genic și cel legat de reglarea expresiei genice, în celulele diferențiate.

Un aspect neobișnuit pentru familia multigenică a actinelor este legat de variația numărului și localizării intronilor. Acest aspect este evident, atunci când se compară deopotrivă genele paraloge, precum gena β-actinei și gena α-actinei scheletice de la șobolan sau genele ortologe precum genele actinice de la plante și nevertebrate. Această situație a organizării genelor pentru actine este cu totul diferită de aceea a majorității genelor ortologe și familiilor multigenice, în cadrul cărora numeroase gene au introni cu localizare identică. Evoluția genelor actinei pare a fi improbabil bazată pe inserții multiple de noi introni. Fiecare asemenea inserție ar trebui să beneficieze de secvențe de joncțiune și sudare corespunzătoare și să conserve cadrul de citire pe fiecare parte a joncțiunii.

O interpretare alternativă admite că cele mai multe gene ancestrale pentru actine au avut introni în toate pozițiile în care ei se întâlnesc în genele actuale și că cei diferiți au fost pierduți, în cursul evoluției diferitelor filumuri.

Genele individuale pentru actină au tendința de a fi dispersate în diferiți cromozomi. La șoarece, de exemplu, genele pentru α-actină din mușchiul scheletic și din mușchiul cardiac sunt situate în cromozomul 3, respectiv în cromozomul 17, pe când gena pentru β-actina citoplasmatică se află în cromozomul 5. Există și pseudogene procesate ale actinelor lipsite de introni. La om, două dintre cele două secvențe corespunzătoare pentru actină, reprezintă pseudogene procesate pentru β-actină, fiind lipsite de introni și conținând numeroase mutații diferite, în cadrul regiunii codificatoare. La *Drosophila*, sunt exprimate două gene pentru actinele citoplasmatice în toate stadiile de dezvoltare, două gene, predominant în stadiul larvar, pupal și adult, la nivelul musculaturii intersegmentare și două gene, predominant în mușchii toracici și ai picioarelor, la adult. Se presupune că expresia genică diferențiată este guvernată de secvențe reglatoare specifice care se asociază cu regiunile flancatoare ale numeroaselor gene.

9. GENELE TUBULINEI

Aceste gene sunt încadrate într-o familie multigenică care include gene pentru două subunități diferite ale proteinei heterodimerice. Microtubulii sunt asociați cu o varietate de procese fundamentale, în toate celulele eucariote, în meioză, mitoză, motilitate celulară și secreție. Nu este surprinzător faptul că structura tubulinei este conservată la toate eucariotele, în același grad în care sunt conservate secvențele ADN care codifică tubulina, în scara filogenetică. Așa se explică faptul că, atunci când se folosesc clone cADN preparate din ARNm purtător de mesaj genetic pentru tubulină, de la pui, acestea reasociază cu genele tubulinei, de la drojdii sau de la mamifere. Tubulina este un heterodimer alcătuit din două polipeptide desemnate α și β. Polipeptidul α conține 450 sau 451 aminoacizi, iar polipeptidul β conține 445 aminoacizi, secvența lor de aminoacizi prezentând o similitudine de 40%. Genele pentru aceste două subunități aparțin aceleiași superfamilii multigenice, dar sunt suficient de diferențiate, încât nu pot reasocia.

Familiile de gene codifică multiple izotipuri ale ambelor subunități α și β, la fiecare specie de eucariote, așa cum rezultă din tabelul 3. Există doar diferențe structurale minore (mai puțin de 10%) în secvența de aminoacizi a diferitelor subunități α sau β, codificate de aceste gene. Cea mai mare divergență se înregistrează în apropierea terminalului carboxil al polipeptidelor.

Tabel 7 Familiile genice pentru tubuline (din Singer și Berg, 1991):

Organismul	Numărul de gene cunoscute a fi funcționale	Numărul aproximativ de pseudogene pentru α și β	Lincate (l) sau dispersate (d)
Saccharomyces cerevisiae	2α, 1β	0	d
Chlamydomonas	2α, 2β	0	d
Trypanosoma	cca. 15α, 15β	0	l (tandem)
Drosophila	4α, 4β	0	d
Ariciul de mare	2α, 3β	0	d
Găină	2α, 7β	10	l, d
Mamifere	cca. 5α, 5β	5	d
Arabidopsis thaliana	1α (posibil 4)	15	d

Variația structurii tubulinelor se leagă de construcția unor tubuli variabili, asociați cu diferite procese celulare, diferite tipuri celulare și diferite stadii de dezvoltare. Izotipurile α și β variate sunt specializate pentru funcții diferite ale microtubulilor. Modificări suplimentare în structura tubulinei sunt realizate prin procesele post-translaționale care contribuie, de asemenea, la specializarea funcțională a microtubulilor. Izotipurile specializate funcțional prezintă un grad înalt de conservare la vertebrate. Așa se explică de ce secvențele carboxi-terminale ale β-tubulinei predominant neurale sunt virtual identice, la numeroase specii neînrudite de vertebrate. Regiunile flancatoare 5' și 3' ale membrilor familiilor multigenice pentru tubulina α și pentru tubulina β prezintă o divergență mai mare decât secvențele codificatoare, ceea ce se pune în legătură directă cu reglarea independentă a expresiei lor. Astfel, una dintre genele pentru α-tubulina de la șoarece este exprimată numai în testicule. La *Drosophila*, concentrațiile de ARNm transcris de pe diferite gene pentru tubuline, variază de la țesut la țesut și cu stadiul de dezvoltare. Una dintre genele pentru α-tubulină este exprimată specific în musculițele mascule adulte, una în ovare și alte două sunt exprimate constitutiv. Singura genă pentru α-tubulina de la drojdia de bere este esențială pentru creștere. O mutantă de drojdie, cu blocarea ciclului celular, desemnată mutantă **cdc** prezintă mutația în gena β-tubulinei. La cele mai multe specii, genele tubulinei sunt

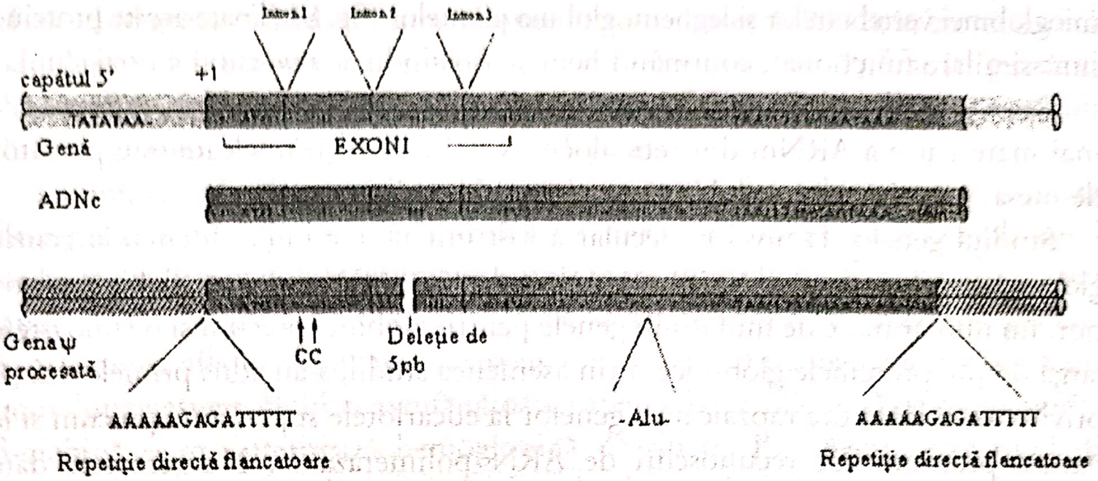


Fig. 7. Relaţia structurală dintre gena α tubulinei de şobolan, ARNm său (ADNc) şi o pseudogenă procesată. Pseudogena a fost modificată în sensul adiţiei a două resturi de C, deleţiei a 5pb şi a inserţiei unei secvenţe Alu (după Singer şi Berg, 1991).

dispersate în genom. La *Drosophila melanogaster*, deşi aproape toate genele pentru tubulină sunt localizate în cromozomul 3, ele nu sunt localizate una lângă cealaltă. La *Tetrahymena brucei*, cele aproximativ 10 copii genice sunt grupate într-un singur şir în tandem, de gene alternative α şi β. La *Leishmania enrietti*, dintre tripanasomide, acelaşi număr de copii genice se grupează în şiruri separate pentru tubulina α şi pentru tubulina β. Multe pseudogene pentru tubuline sunt de tip procesat. Secvenţa genei funcţionale pentru α-tubulina de şobolan a fost descifrată. Există 120 de perechi de baze, între semnalul TATA şi codonul de iniţiere ATGTAC, şi această gena are trei introni, primul fiind localizat imediat după ATG, aşa cum este tipic pentru genele tubulinelor de la vertebrate (fig. 7). Gena procesată a α-tubulinei este flancată pe ambele părţi de repetiţii directe ale unei secvenţe scurte de ADN, o caracteristică comună pseudogenelor procesate. Asemenea repetiţii directe înconjurătoare sunt tipice pentru segmentele ADN care au fost inserţionate prin transpoziţie în noi loci genomici. Ele reprezintă reiterări ale secvenţei care a preexistat la situsul de inserţie şi se numesc **duplicaţii ale situsului ţintă.**

10. SUPERFAMILIA GENELOR GLOBINICE

Hemoglobinele vertebratelor sunt heterotetrameri care conţin câte două catene globin-polipeptidice de tip α şi de tip β. La toate vertebratele există multiple gene şi pseudogene pentru catene α şi β, gene care aparţin unei superfamilii multigenice care cuprinde şi secvenţele codificatoare pentru globinele nevertebratelor, mioglobinei vertebratelor și leghemoglobina plantelor (fig. 8). Toate aceste proteine sunt similare funcțional, conținând hem și asociindu-se reversibil cu oxigenul.

Peste 90% din proteina solubilă a eritrocitelor este hemoglobina, astfel că cea mai mare parte a ARNm din reticulocite și celulele roșii nucleate este purtător de mesaj genetic pentru globină.

Studiul genelor la nivel molecular a fost inițiat și stimulat tocmai la genele globinelor, deoarece cercetătorii au avut la îndemână ARNm pentru globină, relativ pur, un număr mare de mutații în genele pentru globine, precum și o cunoaștere largă despre proteinele globinice. Prin asemenea studii, s-au adus primele dovezi privitoare la structura mozaicată a genelor la eucariotele superioare, precum și la natura promotorilor recunoscuți de ARN polimeraza II. Numeroasele date privitoare la organizarea genelor globinelor umane și la alte grupe de vertebrate au permis realizarea unor studii evolutive, la nivel molecular. Mamiferele au multiple gene pentru α și β globine, precum și pseudogene. La om, genele pentru β-globine sunt grupate într-un sector de ADN de 65 kb, aflat în cromozomul

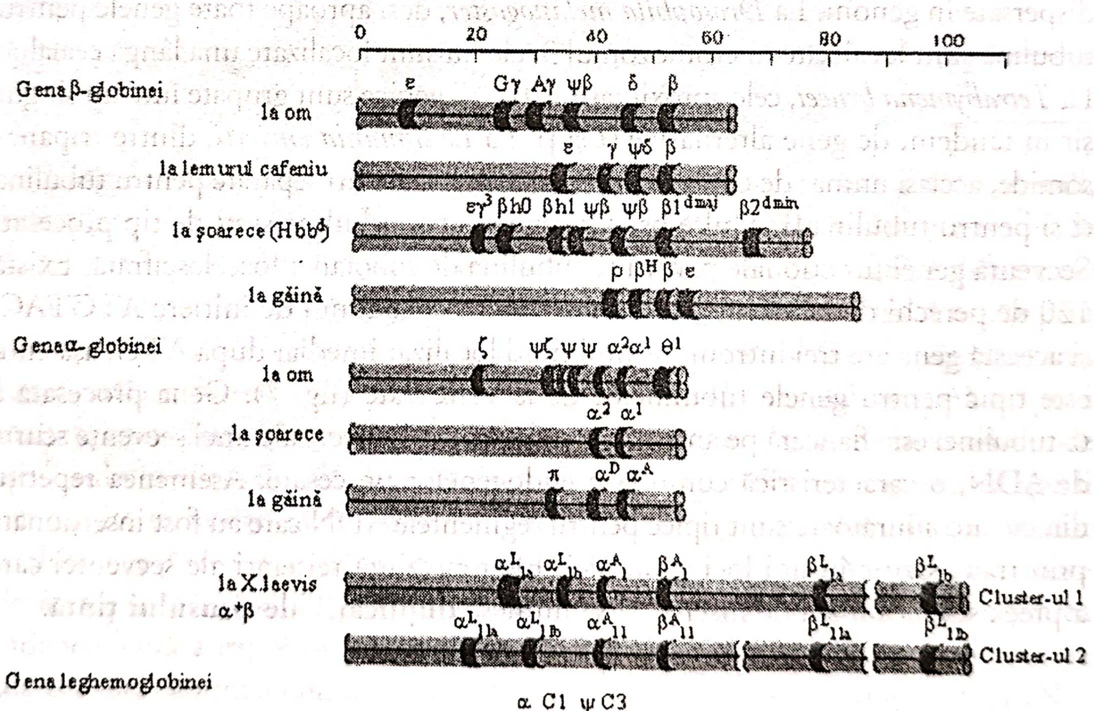

0
20
40
60
80
100
Gena β-globinei
la om
ε Gγ Aγ ψβ δ β
la lemurul cafeniu
ε γ ψδ β
la șoarece (Hbb^d)
εγ^3 βh0 βh1 ψβ ψβ β1^dmaj β2^dmin
la găină
ρ β^H β ε
Gena α-globinei
la om
ζ ψζ ψ ψ α^2 α^1 θ^1
la șoarece
α^2 α^1
la găină
π α^D α^A
la X. laevis
α+β
α^L_1a α^L_1b α^A_1 β^A_1 β^L_1a β^L_1b
Cluster-ul 1
α^L_11a α^L_11b α^A_11 β^A_11 β^L_11a β^L_11b
Cluster-ul 2
Gena leghemoglobinei
la soia
α C1 ψ C3

Fig. 8. Organizarea genelor **β-** și **α-globin-like**, la câteva vertebrate și a genelor leghemoglobinei la soia. Genele sunt reprezentate fără introni. Direcția de realizare a transcrierii este de la stânga la dreapta în toate cazurile. Funcția genei umane α^1–θ^1 nu se cunoaște (după Singer și Berg, 1991).

11, pe când genele α-globinei sunt aranjate într-un cluster de 25 kb, în cromozomul 16. Clusterul β-globinic conține 5 gene desemnate ε, $^{G}\gamma$, $^{A}\gamma$,δ și β, pe când cluster-ul α-globinei conține trei gene desemnate ζ (zeta), α_1 și α_2. În ambii clusteri globinici se află mai multe pseudogene.

La om, ca și la alte mamifere, diferitele gene pentru globine sunt exprimate diferențiat, în diferite etape ale dezvoltării. Genele ζ și ε se exprimă în embrionul foarte tânăr, hemoglobinele umane embrionare fiind de tip ζ_2 și ε_2 . În a 10-a săptămână de gestație sunt activate genele α și γ și se sintetizează hemoglobina $\alpha_2\gamma_2$, care se află în circulație, în cea mai mare parte a perioadei fetale. La scurt timp după naștere, globina asemănătoare catenei β este înlocuită de polipeptidul β-globină și se sintetizează hemoglobină de tip α_2 β_2. Acesta este tipul de hemoglobină care se va sintetiza, în tot cursul vieții individuale.

Gena pentru globina ζ este exprimată la organismele adulte, dar această expresie produce doar o foarte mică parte a catenelor asemănătoare β-globinei. Două polipeptide identice α_1 și α_2 sunt codificate de două gene pentru α-globină. Deși genele α_1 și α_2 sunt exprimate în același timp, gena α_2 este transcrisă mai eficient și asigură cea mai mare parte a catenelor α. La om, ca și la multe alte specii, nu însă la toate, ordinea genelor din clusterii α și β este aceeași cu ordinea în care acestea sunt exprimate în cursul dezvoltării, mergând în direcția transcripției de la stânga la dreapta, în diagrama din figura de mai sus.

Istoria evolutivă a genelor globinelor umane este cea mai clară, față de a altor gene. Se admite că a existat o singură genă pentru o globină, într-un strămoș dispărut al speciilor actuale de vertebrate. Acum peste 400 de milioane de ani s-a produs o amplificare a acestei gene, deoarece, deși ciclostomii (agnate) au o singură catenă globinică, peștii (gnatostome) au două catene globinice α, respectiv β. La amfibieni, precum *Xenopus laevis*, genele α și β-globinelor sunt strâns lincate în tandem, cum se presupune a fi și la pești. De notat că la *Xenopus* sunt doi clusteri diferiți de gene globinice lincate, ceea ce reflectă faptul că în acest caz, genomul este tetraploid și cele două seturi de cromozomi, acumulând diferențieri structural-funcționale, au evoluat separat. La pasări și mamifere, genele globinelor α și β nu sunt lincate. Nu se știe dacă separarea lor s-a produs prin diviziunea unui cluster, așa cum se întâlnește la *Xenopus*, sau prin amplificare independentă a genelor individuale, după transpoziție. Se admite că genele hemoglobinelor la păsări și la mamifere au evoluat separat, începând de acum 250-300 milioane de ani, așa cum dovezile paleoantropologice au stabilit această divergență.

Prima duplicație în tandem a genei β a apărut acum 200 milioane de ani, înainte de inițierea evoluției mamiferelor moderne. Componentele reglatoare ale celor două gene β au suferit divergență, ceea ce a făcut ca una să fie exprimată de timpuriu, cealaltă târziu, în cursul dezvoltării.

Duplicațiile ulterioare în tandem au variat de la o specie la alta, ceea ce a condus la aranjamentul complex de gene și pseudogene, din organismele actuale. În linia care a condus la primate, fiecare din cele două gene β-globinice s-a duplicat din nou, deși nu în același timp. Această succesiune de evenimente ale duplicației a condus la organizarea clusterului de patru gene de tip β-globină, care este aranjamentul de bază la toate primatele: la specia umană, ε și γ sunt exprimate în cursul embriogenezei timpurii, iar ζ și β au exprimare târzie, în cursul dezvoltării intrauterine. Genele $^{G}\gamma$ și $^{A}\gamma$ derivă dintr-o duplicație a genelor γ care este tipică maimuțelor Lumii Vechi și probabil a avut loc acum 20-40 de milioane de ani. Evenimentele similare pot fi deslușite în evoluția clusterului α-globinei.

Se cunoaște întreaga secvență de nucleotide a clusterului genei β-globinei la om, precum și mari părți din clusterii β-globinelor altor specii, ceea ce a permis realizarea comparației filogeniei bazate pe numărul de gene și recorduri fosile și a aceleia bazată pe ipoteza ceasului molecular. Există un acord rezonabil între cele două interpretări, comparațiile in detalii fiind insă doar informative. Asemenea studii sugerează că primii doi exoni ai genelor Aγ si Gγ au fost corectați până la uniformizare, timpul de divergență foarte recent, estimat după secvența de nucleotide definind timpul de omogenizare nu și timpul de duplicație.

Similitudinea mioglobinei si hemoglobinei este de multă vreme cunoscută. Leghemoglobina prezintă 15% similitudine cu globinele vertebratelor, ceea ce a permis încadrarea acesteia în aceiași familie, admițându-se descinderea lor dintr-un același strămoș, datele de secvențiere, mai ales acelea referitoare la poziția intronilor, susținând o asemenea interpretare.

Toate genele globinelor vertebratelor și ale mioglobinelor au doi introni, în poziții înalt conservate (fig. 9), primul plasat în apropierea codonului 30, de la terminalul NH_2. Cel de al doilea intron se află între doi codoni, la cel de al 100-lea codon. Doi dintre cei trei introni ai genei pentru leghemoglobina plantelor ocupă virtual aceeași poziție cu intronii genelor globinei vertebratelor. Cel de al treilea intron se află aproximativ la mijlocul regiunii codificatoare.

Analiza distribuției intronilor în genele globinelor, sprijină ideea că exonii individuali codifică domenii structurale și funcționale distincte ale polipeptidului. Structurile tridimensionale ale subunităților globinelor vertebratelor prezintă mai multe regiuni de contact, aflate la distanță unele de altele. Două dintre aceste regiuni de contact corespund exonilor 1 și 3 (resturile de aminoacizi 1-30 și 105-146) din catena β globinei. Dar, o altă pereche de regiuni, distante dar compacte, (resturile 40-60 și 70-100) nu corespund la cei doi exoni. Dacă relația dintre exoni și domeniile structurale ale polipeptidului este reală, atunci ar trebui să apară un intron între aceste regiuni. O asemenea predicție s-a adeverit, atunci când în gena leghemoglobinei de soia a fost identificat cel de al treilea intron, inexistent in genele

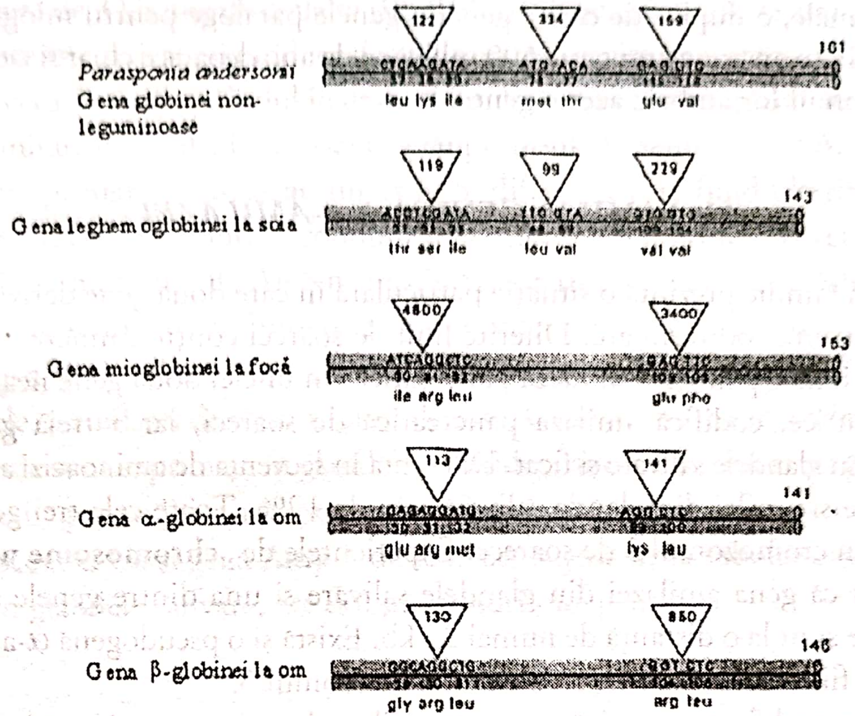

Parasponia andersonii
Gena globinei non-leguminoase
122
334
159
101
leu lys ile
met thr
glu val
Gena leghemoglobinei la soia
119
99
229
143
thr ser ile
leu val
val val
Gena mioglobinei la focă
4800
3400
153
ile arg leu
glu phe
Gena α-globinei la om
113
141
141
glu arg met
lys leu
Gena β-globinei la om
130
850
146
gly arg leu
arg leu

Fig. 9 — Poziția intronilor în cazul genelor din superfamilia globinei. Numărul aminoacizilor (codonilor) din fiecare proteină este indicat în dreapta figurii. Codonul de inițiere, ATG nu este luat în considerație pentru că metionina este îndepărtată din polipeptidul matur. Intronii sunt reprezentați de triunghiuri având înscrisă în interior dimensiunea lor în pb. Sunt, de asemenea, reprezentați numărul codonilor și aminoacizii corespunzători, care flanchează intronul (după Singer și Berg, 1991).

globinelor vertebratelor. Ancestorul comun al tuturor genelor din familia globinelor actuale a conținut cu cea mai mare probabilitate, cel puțin trei introni. Relația domeniu-exon poate fi evidențiată și în aspectele funcționale ale globinelor. De exemplu, regiunea dintre aminoacizii 65 și 96 leagă hemul, conținând totodată aminoacizi implicați în formarea dimerului globinic αβ. In mod asemănător, aminoacizii ceruți în formarea tetramerului $\alpha_2\beta_2$ sunt dispuși grupat în exonul 3.

Genele leghemoglobinei sunt întâlnite doar la plantele leguminoase și anume acele care formează simbioze cu microorganisme fixatoare de azot, de tip *Rhizobium*. Sunt și unele plante neleguminoase care formează asemenea asociații. Asemenea specii au dobândit genele globinice prin transfer ocazional dintr-un alt genom (de exemplu prin infecție virală), mai curând decât pe linie evolutivă verticală. Ca și la animale, și la plantele care au în genomul lor genele leghemoglobinei, o genă ancestrală s-a multiplicat spre a forma familii multigenice grupate, ce cuprind gene funcționale și pseudogene.

La animale, o duplicație care a generat genele paraloge pentru mioglobină și hemoglobină a apărut acum peste 500 milioane de ani, deoarece chiar și ciclostomii au în genomul lor ambele aceste gene.

11. FAMILIA GENICĂ A *α-AMILAZEI*

Această familie prezintă o situație particulară în care două gene derivă dintr-o aceeași secvență codificatoare. Diferite linii de șoareci conțin numere variate de gene funcționale pentru α-amilaza pancreatică. In unele, două gene nealelice, în esență identice, codifică amilaza pancreatică de șoareci, iar a treia genă este exprimată în glandele salivare și ficat. Diferența în secvența de aminoacizi a enzimei pancreatice și a celei din glanda salivară este de 12%. Toate cele trei gene sunt localizate în cromozomul 3 de șoarece. Experiențele de „**chromosome walking**" au dovedit că gena amilazei din glandele salivare și una dintre genele amilazei pancreatice sunt la o distanță de numai 22 kb. Există și o pseudogenă α-amilazică la șoarece, fiind lincată cu clusterul din cromozomul 3.

Regiunea codificatoare unică pentru α-amilaza de șoarece, exprimată în glandele salivare și ficat este precedată de două regiuni de control transcripțional situate

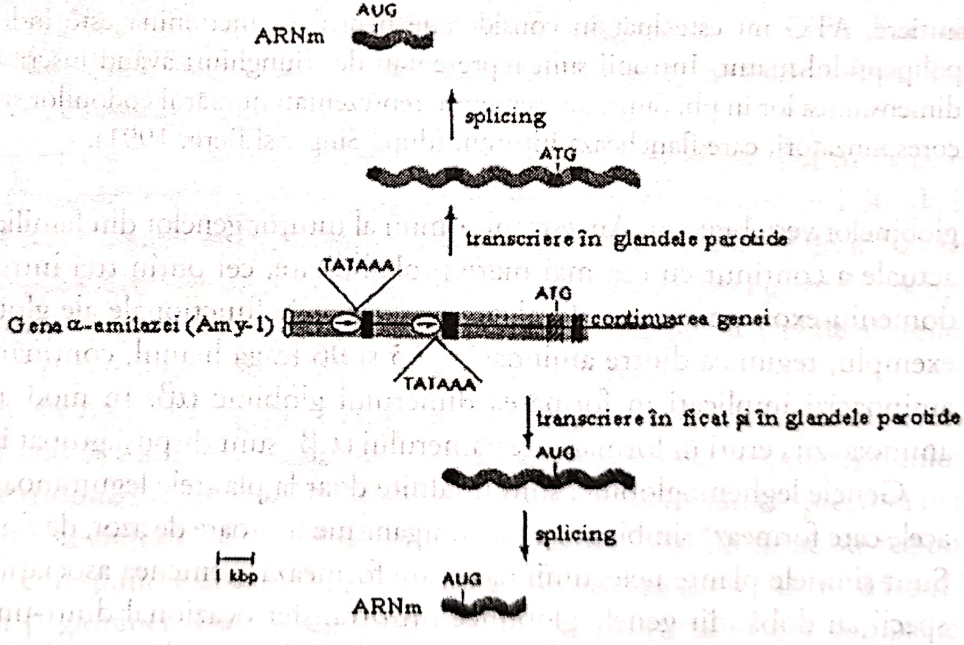

ARNm
AUG
splicing
ATG
transcriere în glandele parotide
TATAAA
ATG
Gena α-amilazei (Amy-1)
continuarea genei
TATAAA
transcriere în ficat şi în glandele parotide
AUG
splicing
1 kbp
AUG
ARNm

Fig. 10. Secvența codificatoare a α-amilazei de șoarece are doi promotori: unul este folosit pentru nivel scăzut de transcriere în ficat și glandele parotide pe când celălalt permite transcrierea intensă în glandele parotide (după Singer și Berg, 1991).

la o distanță de 3 kb una de cealaltă (fig. 10). In glanda parotidă, la adult, unitatea din amonte este activată și produce de 30 de ori mai multe transcripte decât unitatea din aval, ceea ce explică nivelul înalt de α-amilază, caracteristic glandelor parotide. Fiecare unitate de control este asociată cu propriul său semnal TATA. Cele două transcripte primare produse au un exon 5' diferit, fiecare fiind ulterior sudat la același exon, cel care conține codonul de inițiere AUG. Astfel, secvența lider 5' a celor două molecule de ARNm rezultate este diferită față de cealaltă. Exonul care include semnalul de inițiere a transcripției pentru expresia de nivel scăzut este parte a intronului care este eliminat din ARN specific parotidei.

Genele α-amilazei de șobolan sunt diferite. Gene distincte care codifică diferite polipeptide sunt exprimate în glandele parotide, pancreas și ficat și cel puțin patru gene diferite pot codifica amilaza pancreatică. Apar, de asemenea, pseudogene sau gene procesate. Ca și gena **Amy-1** de șoarece, o genă de la șobolan, exprimată în ficat și în glandele salivare, are doi promotori independenți.

12. GENELE PENTRU INTERFERON

La multe vertebrate, celulele secretă polipeptide numite interferoni (**IFN**) ca răspuns la o varietate de stimuli externi. La om există trei tipuri de asemenea interferoni, desemnate **IFN-α**, **IFN-β** și **IFN-γ**, fiecare fiind produs în celule specializate, sub direcția unor gene caracteristice, așa cum rezultă din tabelul 8:

Tabel 8: Interferoni umani

Tipul de interferon	**IFN-α**	**IFN-β**	**IFN-γ**
Tipul de celulă în care este produs	Leucocite	Fibroblaste	Sistem imunitar
Numărul de gene nealele	Ø15	Ø2	1
Gene procesate sau pseudogene	>3	?	?
Localizare cromozomală	9p	9p; altele	12 (q24.1)
Introni	Nici unul	Nici unul	3
Omologia cu geneleIFN-α	85-95	50	Puțină
Omologie cu polipeptidele IFN-α (%)	80	30	<10
Dimensiunea proteinei (număr de aminoacizi)	155-166	166	146

Genele pentru interferoni codifică și peptide semnal de 20-23 aminoacizi care sunt îndepărtate în cursul translației.

Infecțiile virale și ARN dublu-catenar declanșează sinteza unui set de IFN-α în leucocite și un set înrudit de IFN-β, în fibroblaste. In cadrul fiecărui set, diferitele proteine au structuri foarte asemănătoare. O proteină foarte diferită, unică, desemnată IFN-γ sau **interferonul imun** este produs în limfocite, prin stimularea replicării ADN de către mitogeni. Toate tipurile de interferon declanșează, la rândul lor, răspunsuri celulare, printre care și inhibiția infecției virale, modularea răspunsului imun și activitatea antitumorală. Importanța potențială a interferonilor ca agenți antivirali și antitumorali a stat la baza impulsului în studierea lor. Dacă la început au existat dificultăți legate de cantitatea foarte mică de interferon produsă de celulele stimulate, ulterior, introducerea tehnologiei ADN recombinant a permis transferul genelor pentru interferon în bacteria *Escherichia coli* și producerea lor industrială. ARNm, purtător al mesajului genetic pentru IFN-γ se află în procent de 0,04% printre ARN-urile poliadenilate din limfocitele stimulate. S-a injectat asemenea molecule de ARNm în ovocite de *Xenopus* și s-au separat cele producătoare de IFN-γ. După aceea, acest ARNm pentru IFN-γ a fost izolat și convertit în cADN dublu-catenar care, la rândul lui, a fost inserționat într-un vector plasmidic. Coloniile transformate au fost supuse *screening*-ului diferențiat. Secvențele codificatoare de IFN-γ au fost identificate în coloniile care reasociau probele de cADN din limfocitele stimulate, nu însă și din cele normale. Clonele de cADN au fost ulterior utilizate ca probe pentru izolare genei IFN-γ. Pe aceeași cale au fost izolate și secvențiate genele pentru celelalte tipuri de interferon și, prin deducție, s-a stabilit secvența de aminoacizi a interferonilor.

Printre segmentele de ADN uman clonate și care conțineau genele IFN-α, unele cuprindeau mai mult decât o singură genă, pe când altele reprezentau regiuni genomice suprapuse.

Prin hibridizare *in situ* s-a stabilit localizarea cromozomală unică pentru gena IFN-α, ceea ce a constituit dovada că genele care codifică diferite tipuri de IFN-α, sunt strâns lincate. Analiza genetică a arătat că genele IFN-α sunt vecine apropiate ale genelor pentru IFN-β, în cromozomul uman 9. Gena singulară a IFN-α se află într-un alt cromozom, și anume cromozomul 12. Genele învecinate au structură similară. De exemplu, genele IFN-α și genele IFN-β, din cromozomul 9, nu au introni, fiind similare, atât ca structură a secvenței codificatoare, cât și în regiunile flancatoare. Dimpotrivă, gena IFN-γ, din cromozomul 12, care are foarte puțină similitudine cu genele IFN-α și IFN-β, atât la nivelul secvenței codificatoare, cât și la nivelul secvențelor flancatoare, conține trei introni.

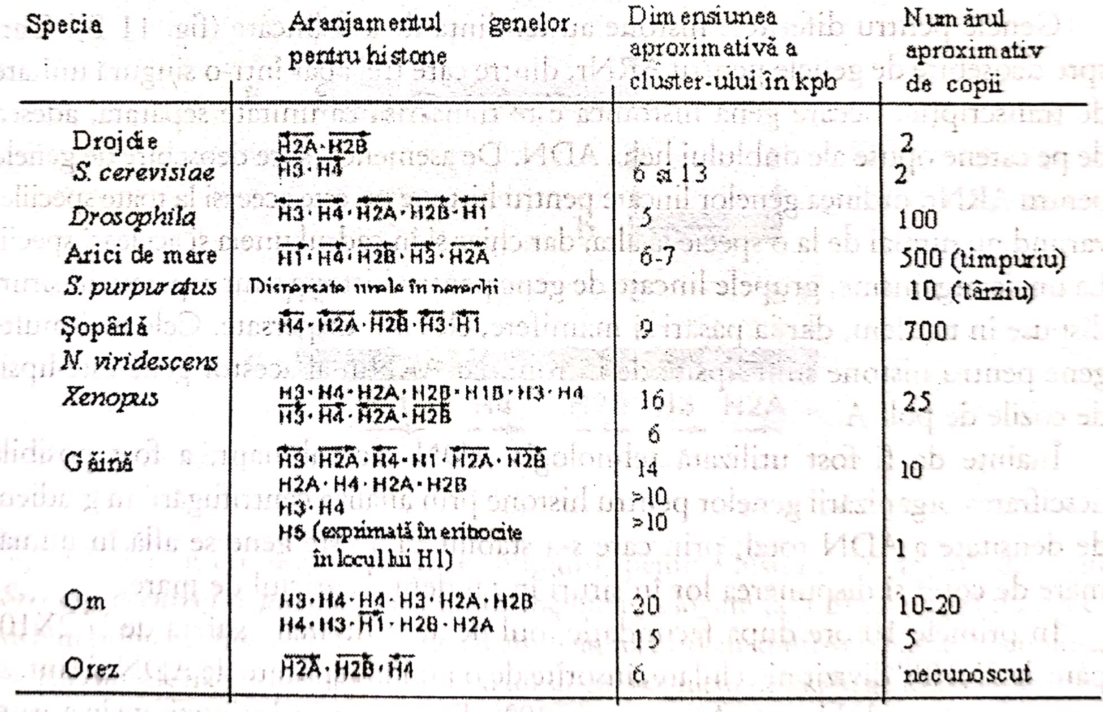
Genele din familia genică a interferonilor de la alte mamifere au proprietăți generale similare.

13. GENELE PENTRU HISTONE

Structura primară a histonelor este înalt conservată, la diferite eucariote, ceea ce este o reflectare a rolului lor fundamental și comun în structura cromatinei. Există însă și unele variații structurale.

Histonele H1 prezintă cea mai mare divergență, comparativ cu variația structurală a celorlalte fracții histonice. Cele mai conservatoare ca structură sunt histonele H3 si H4. Există unele mici diferențe structurale ale histonelor, în cursul dezvoltării la anumite specii, diferențe legate de etapele ciclului celular sau de tipul de țesut. De exemplu, expresia celor mai multe gene pentru histone se corelează cu faza S a ciclului celular, și deci cu replicarea ADN. Expresia altora, numite gene de tip înlocuire, are loc în tot cursul ciclului celular, dar această expresie are un nivel scăzut. Spre deosebire de conservatorismul secvențelor polipeptidice, numărul și aranjamentele genelor pentru histone diferă remarcabil între specii, așa cum rezultă din figura 11.

Astfel, ca și în cazul organizării genelor pentru ARNt, conservarea secvențelor codificatoare nu trebuie asociată cu conservarea numărului de copii sau a distribuției genomice a acestor gene.



Specia	Aranjamentul genelor pentru histone	Dimensiunea aproximativă a cluster-ului în kpb	Numărul aproximativ de copii
Drojdie *S. cerevisiae*	$\overleftarrow{\text{H2A}}\cdot\overrightarrow{\text{H2B}}$ $\overleftarrow{\text{H3}}\cdot\overrightarrow{\text{H4}}$	6 și 13	2 2
Drosophila	$\overleftarrow{\text{H3}}\cdot\overrightarrow{\text{H4}}\cdot\overleftarrow{\text{H2A}}\cdot\overrightarrow{\text{H2B}}\cdot\overleftarrow{\text{H1}}$	5	100
Arici de mare *S. purpuratus*	$\overrightarrow{\text{H1}}\cdot\overrightarrow{\text{H4}}\cdot\overrightarrow{\text{H2B}}\cdot\overrightarrow{\text{H3}}\cdot\overrightarrow{\text{H2A}}$ Dispersate unele în perechi	6-7	500 (timpuriu) 10 (târziu)
Şopârlă *N. viridescens*	$\overleftarrow{\text{H4}}\cdot\overleftarrow{\text{H2A}}\cdot\overrightarrow{\text{H2B}}\cdot\overleftarrow{\text{H3}}\cdot\overleftarrow{\text{H1}}$	9	700
Xenopus	H3·H4·H2A·H2B·H1B·H3·H4 $\overrightarrow{\text{H3}}\cdot\overrightarrow{\text{H4}}\cdot\overleftarrow{\text{H2A}}\cdot\overrightarrow{\text{H2B}}$	16 6	25
Găină	$\overleftarrow{\text{H3}}\cdot\overrightarrow{\text{H2A}}\cdot\overleftarrow{\text{H4}}\cdot\text{H1}\cdot\overleftarrow{\text{H2A}}\cdot\overrightarrow{\text{H2B}}$ H2A·H4·H2A·H2B H3·H4 H5 (exprimată în eritrocite în locul lui H1)	14 >10 >10	10 1
Om	H3·H4·H4·H3·H2A·H2B H4·H3·$\overrightarrow{\text{H1}}$·H2B·H2A	20 15	10-20 5
Orez	$\overrightarrow{\text{H2A}}\cdot\overrightarrow{\text{H2B}}\cdot\overleftarrow{\text{H4}}$	6	necunoscut

Fig. 11A. Exemple tipice de grupuri lincate de gene pentru histone, la diferite specii. Nu toate grupurile de la aceeași specie sunt neapărat la fel. La om, și probabil și la alte specii, unele copii sunt pseudogene. Acolo unde este cunoscută direcția de realizare a transcrierii este indicată prin săgeți (după Singer și Berg, 1991).

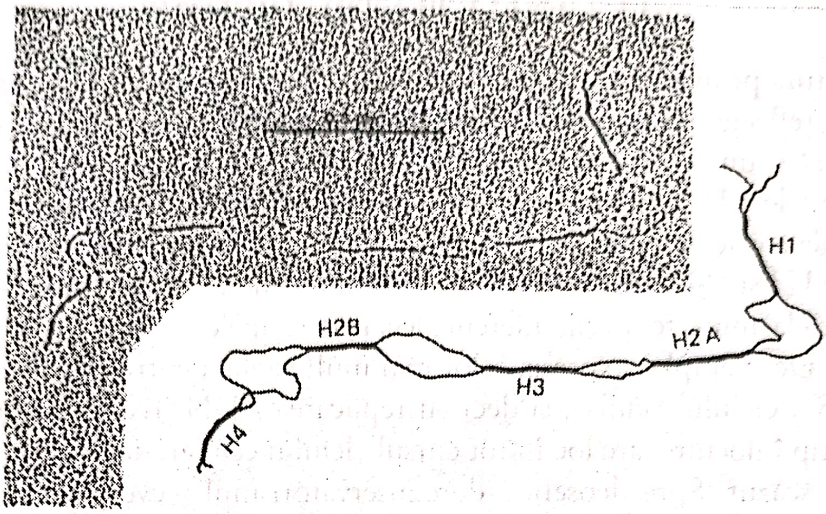


Fig. 11B — ADN parțial denaturat cuprinzând cluster-ul genelor pentru histone de la ariciul de mare *Strongylocentrotus purpuratus*. Genele H1, H2A, H2B, H3 și H4 sunt relativ bogate în GC și, în consecință, rămân ca structură duplex la 61°C, pe când spațiatorii bogați în AT suferă denaturare (după Portmann, Schaffner și Birnstiel, 1976).

Genele pentru diferitele histone au tendința de a fi lincate (fig. 11 B). Dar, spre deosebire de genele pentru ARNr, dintre care trei apar într-o singură unitate de transcripție, fiecare genă histonică este transcrisă ca unitate separată, adesea de pe catene opuse ale dublului helix ADN. De asemenea, spre deosebire de genele pentru ARNr, ordinea genelor lincate pentru histone nu este aceeași la toate speciile, variind nu numai de la o specie la alta, dar chiar și în cadrul uneia și aceleași specii. La unele organisme, grupele lincate de gene pentru histone sunt repetate în șiruri dispuse în tandem, dar la păsări și mamifere, ele sunt dispersate. Cele mai multe gene pentru histone sunt lipsite de introni, iar ARNm al acestor gene este lipsit de cozile de poli-A.

Înainte de fi fost utilizată tehnologia ADN recombinant, a fost posibilă descifrarea organizării genelor pentru histone prin analiza centrifugării în gradient de densitate a ADN total, prin care s-a stabilit că aceste gene se află în număr mare de copii și dispunerea lor în șiruri în tandem, la ariciul de mare.

In primele 10 ore după fecundație, oul de arici de mare suferă de la $2X10^9$ până la $2X10^{10}$ diviziuni celulare, însoțite de o rapidă replicare de ADN și sinteză corespunzătoare de histone. Aproximativ 30% dintre proteinele sintetizate în această perioadă sunt proteine nucleare, ceea ce face ca ARNm care sedimentează în jur de 9S să fie cel care poartă mesajul genetic pentru sinteza histonelor. Prin electroforeză pe geluri de poliacrilamidă se pot separa aceste molecule de ARNm, după greutatea lor moleculară, aceasta fiind specifică fiecărui tip de ARNm pentru fracțiile histonice individuale. Acestea pot fi apoi identificate prin translația in vitro în polipeptidele corespunzătoare. ARNm-urile pentru histone, de la ariciul de mare, au fost utilizate ca probe pentru cartarea genelor histonice la plante, fungi și animale.

La ariciul de mare, un set special de gene asigură sinteza rapidă a histonelor în primele stadii de dezvoltare embrionară, dar după blastulație, este stimulată expresia unui alt set, diferit, de gene pentru histone, expresie responsabilă pentru cea mai mare parte a sintezei histonelor pentru restul dezvoltării embrionare și perioada adultă. Cele două seturi de gene pentru histone se numesc **genele pentru histone timpurii** și **genele pentru histonele târzii** ale ariciului de mare. Organizarea acestor seturi de gene pentru histone variază de la o specie la alta de arici de mare. Cel mai bine studiată este organizarea acestor gene la *Strongylocentrotus purpuratus* (fig. 12). Segmentele genomice care conțin genele timpurii au fost clonate dintr-o bibliotecă de fragmente EcoRI, utilizând ca probă ARNm total

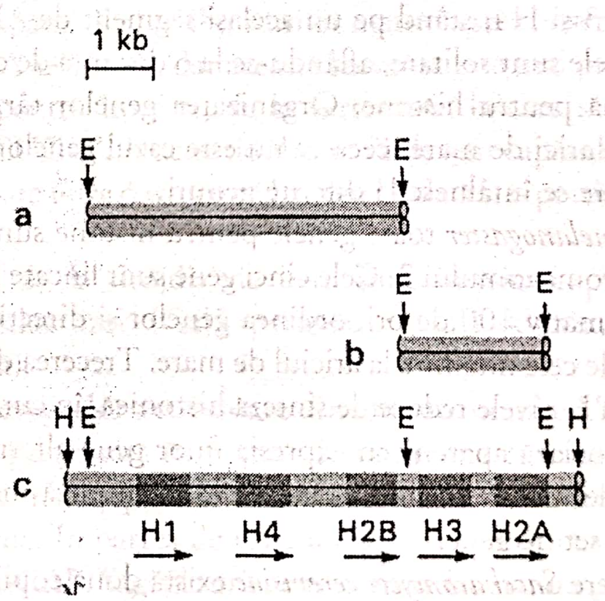


Fig. 12. Un grup lincat de gene timpurii pentru histone la ariciul de mare (***Strongylocentrotus purpuratus*)**. Două fragmente clonate (a și b) care hibridizează cu ARNm primar al histonei și nu unul cu altul, au fost izolate dintr-o bibliotecă genomică EcoRI. Ambele fragmente hibridizează cu un singur fragment de 7kpb, generat prin clivarea ADN genomic cu endonucleaza HindIII (c). După dubla digestie a ADN genomic cu endonucleaza EcoRI și HindIII, fragmentul de 7kpb nu hibridizează cu nici unul din cele două fragmente (a sau b). În schimb, două fragmente de dimensiunile lui a și, respectiv ale lui b au hibridizat cu un amestec de a și b. De aceea, s-a dedus că aceste două fragmente sunt lincate în cadrul unui segment de 7kpb de ADN genomic (din Singer și Berg, 1991).

pentru histone. S-au obținut două fragmente clonate care nu realizează hibridarea încrucișată unul cu celălalt. Cartarea genică a indicat că cele două fragmente sunt totuși lincate în cadrul unui segment genomic de 7kb. Experiențe de renaturare a ADN cu ARNm separat electroforetic și analiza la microscopul electronic a heteroduplexurilor rezultate a evidențiat faptul că toate tipurile de ARNm pentru histone se asociază complementar doar cu una dintre cele două catene ale ADN pentru histone, ceea ce înseamnă că fiecare dintre cele cinci gene pentru histone este transcrisă în aceeași direcție. Secvențierea acestor gene pentru histone a confirmat aceste concluzii, stabilind dimensiunile precise ale regiunilor codificatoare și ale spațiatorilor dintre ele. Cele câteva sute de copii ale grupului lincat de gene pentru histonele timpurii apar în lungi șiruri dispuse în tandem.

Genele histonelor târzii sunt repetate de numai 10 ori, spre deosebire de genele histonelor timpuriii care sunt repetate de 500 de ori.

Genele timpurii nu sunt nici lincate în grupuri de câte cinci și nici dispuse în repetiții în tandem. Unele perechi de asemenea gene sunt învecinate, așa cum sunt cele pentru H3 și H4, stând pe un același segment de ADN, la o distanță de 1kb, pe când altele sunt solitare, aflându-se la o distanță de cel puțin 6kb, față de oricare altă genă pentru histone. Organizarea genelor târzii este diferită la diferitele genuri de arici de mare, ceea ce nu este cazul genelor timpurii, în care aranjamente similare se întâlnesc la diferite genuri.

La *Drosophila melanogaster* toate genele pentru histone sunt localizate într-o singură regiune a cromozomului 2. Cele cinci gene sunt lincate într-o unitate care se repetă de aproximativ 100 de ori, ordinea genelor și direcțiile de transcripție fiind total diferite de cele întâlnite la ariciul de mare. Trecerea de la nivelele înalte de sinteză histonică la nivele reduse de sinteză histonică, în cursul embriogenezei drosofilei, nu se asociază aparent cu expresia unor gene alternative, așa cum se întâmplă la aricii de mare, ci, mai curând, aceasta implică modularea expresiei genelor din același set de gene.

La drojdia de bere *Saccharomyces cerevisiae* există două copii ale unui segment care conține o genă pentru histona H_2A și una pentru histona H_2B și două copii ale unui segment care conține o genă pentru H_3 și una pentru H_4. Genele omoloage din cadrul perechilor de clusteri pot codifica proteine cu secvențe de aminoacizi ușor diferite (cazul histonelor H_2A) sau cu secvențe identice (cazul H_3), fără a se ști dacă asemenea ușoare variații au vreo semnificație funcțională. La drojdii nu a fost identificată histona H1. Aceasta se corelează cu absența condensării cromatinei și implicit a individualizării morfologice la debutul diviziunii nucleare și tipul particular de mitoză întâlnit la aceste eucariote inferioare.

Ca și nevertebratele, vertebratele au o diversitate de aranjamente ale genelor pentru histone. De exemplu, la *Xenopus* apar mai multe grupe de câte cinci gene diferite pentru histone, dar ele au diferite ordonări ale genelor individuale. La tritonul *Notophtalmus (Triturus) viridescens* există aproximativ 700 de copii de gene pentru histone, segmentul de ADN care conține genele pentru cele cinci fracții histonice având 9kb lungime, fiecare segment fiind inclus într-un șir lung de repetiții în tandem ale unei secvențe neînrudite, dispuse într-un braț cromozomal. Există 50-100kb de repetiții în tandem neînrudite, între fiecare grup de gene histonice. Aceeași secvență repetată în tandem apare, de asemenea, la nivelul centromerilor.

Animalele homeoterme au relativ puține gene pentru histone. Ele nu sunt grupate uniform, nici nu sunt dispuse în șiruri în tandem, deși genele din vecinătatea lor prezintă asemenea caracteristici.

14. SECVENȚE CONSENS

La preARNm-urile pentru histonele de la ariciul de mare, secvența din aval de ce va deveni capătul 3' al ARNm-urilor mature este conservată în mod absolut și este 5'- CAAGAAAGA-3', dar această secvență este mai puțin înalt conservată la ARNm-urile pentru histone, de la vertebrate, la care secvența consens este 5'-PuAAAGAGCUG-3'. Nucleotidul care va deveni capătul 3' al ARNm matur pentru histone apare între o structură hairpin buclată și o porțiune bogată in purine (GAAAG).

Genele GAL de la drojdia de bere sunt implicate prin produșii lor în metabolizarea galactozei (Gal2=permeaza; Gal1=kinaza, Gal7=transferaza, Gal10=epimeraza).

Localizarea **secvențelor activatoare din amonte** numite **UAS**-uri în promotorii genelor Gal este prezentată în figura 13, împreună cu motivul comun TATA, situsurile de start transcripțional (săgeți ondulate) și motivele UAS fiind redate ca bare transversale. In partea de jos a imaginii se prezintă secvența CONSENS a 13 secvențe UASGAL. Săgețile orientate opus redau natura palindromică a acestei secvențe consens. **UAS** este termenul generic pentru secvențele cis reglatoare numite **secvențe activatoare din amonte**, de la drojdii. Ele seamănă cu enhancerii, prin aceea că funcția lor este independentă de orientare și relativ independentă față de distanța la care se află. UASGAL a fost prima identificată pe un segment de ADN între genele GAL1 si GAL10, după capacitatea sa de a conferi promotorului GAL1 activare transcripțională dependentă de proteina GAL4. Analiza de deleție a acestei regiuni a identificat multiple copii ale unei secvențe palindromice de 17 baze, ca motiv secvențial esențial. Intre 1 si 4 asemenea elemente de secvență apar în intervalul cuprins între a 200-a si a 400-a pereche de baze în amonte de secvențele genice GAL1, GAL2, GAL7, GAL10, si GAL80, deși numai două asemenea secvențe sunt suficiente să asigure activare maximă. Oricare dintre secvențele UASGAL sau un oligonucleotid sintetic care conține secvența consens, conferă expresie dependentă de GAL4, de înalt nivel, atunci când este plasată în amonte față de o varietate de promotori bazali de drojdie.

Din cele relatate mai sus rezultă că o *secvență* **CONSENS** *reprezintă secvența medie sau partea care este comună mai multor secvențe dintr-o familie de secvențe repetate*, fiecare fiind diferite de celelalte doar in câteva (puține) poziții ale secvenței integrale de nucleotide. Astfel, secvența consens devine reprezentativă pentru toate aceste secvențe ale familiei considerate.

O secvența consens reprezintă cea mai frecventă bază din fiecare poziție din ansamblul de molecule care constituie familia sau populația de secvențe considerată. SECVENȚA CONSENS poate fi reprezentativă pentru familia de secvențe, dar nu este necesar identică la nici unul dintre membrii acestei familii.

In analiza practică de laborator, pentru detectarea membrilor unei familii de secvențe, se aplică principiul că secvențele care au o divergență doar de 15-20% față de o secvență consens, reprezintă membrii ai acelei familii de secvențe.

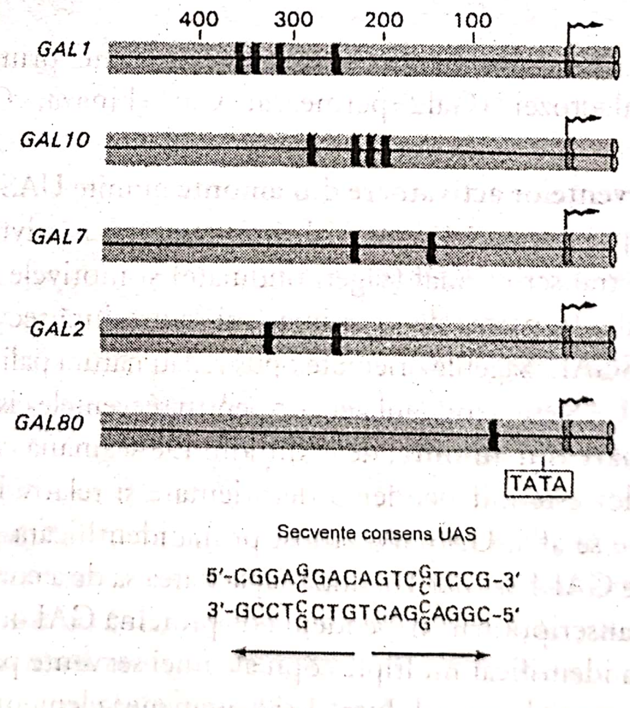

400
300
200
100
GAL1
GAL10
GAL7
GAL2
GAL80
TATA
Secvente consens UAS
5'-CGGA G/C GACAGTC G/C TCCG-3'
3'-GCCT C/G CTGTCAG C/G AGGC-5'

Fig. 13 — Secvențe consens (după Singer și Berg, 1991).

CAPITOLUL V

REPLICAREA ACIZILOR NUCLEICI

Termenul de replicare derivă de la cuvântul englez „*to replicate* „care înseamnă a copia. Sinteza de noi molecule de ADN se realizează printr-un proces de copiere unic în lumea macromoleculelor și în lumea vie, proces care se numește *REPLICARE.* Replicarea este caracteristică doar acizilor nucleici, fiind o dovadă clară a înaltului grad de organizare la nivel molecular și celular a sistemelor biologice și a funcționării unor mecanisme de control de înaltă fidelitate și rigoare. Acizii nucleici prezintă o structură uimitor de potrivită pentru realizarea replicării în care, dintr-o moleculă inițială iau naștere două molecule identice între ele și totodată identice cu molecula inițială. Astfel, molecula inițială își „topește“ identitatea în cele două molecule fiice care derivă din ea și care sunt identice ei. Se asigură, pe de o parte, reproducerea fidelă și continuitatea fenomenului ereditar, de-a lungul generațiilor, iar pe de altă parte, dublarea cantității de informație genetică și, ca urmare, multiplicarea sistemelor biologice.

Deoarece ADN conține informația genetică a celulei, sinteza sa este unul dintre cele mai importante evenimente din viața acesteia. Realizată prin intervenția unui complex aparat enzimatic, sinteza ADN este o reacție de tip replicativ, reprezentând unicul caz din lumea biomoleculelor în care o substanță își modelează propria sa sinteză.

I. GENERALITĂȚI

Replicarea ADN — cea mai importantă reacție din lumea vie — asigură continuitatea vieții și totodată variabilitatea lumii vii. Ea este o condiție *sine-qua-non* a diviziunii celulare,-“*o punte între trecut și viitor*“-, după expresia lui C. Darlington – marele citogenetician englez al secolului XX.

Analiza sistemelor autoreplicative a condus la descifrarea următoarelor principii:

1. Informația genetică pe care o conține orice moleculă de acid nucleic cu rol de substanță ereditară este reprezentată de secvența sa de baze azotate, astfel că rolul primar al oricărei modalități de replicare este acela de a dubla, adică de a duplica secvența de baze a moleculei parentale;

2. Specificitatea împerecherii adeninei cu timina și a guaninei cu citozina constituie mecanismul esențial care asigură exactitatea autoreproducerii acestora și care este utilizat de către toate sistemele biologice;

3. Monomerii acizilor nucleici –nucleotidele- sunt adăugați individual, unul câte unul, la capătul unei catene în creștere, de către o enzimă polimerizatoare:

-ADN-polimeraza, în cazul replicării ADN;

-ARN-replicaza, în cazul replicării ARN viral al ribovirusurilor;

-reverstranscriptaza, în cazul replicării ARN viral al retrovirusurilor;

-ARN-polimeraza, în cazul trancripției genetice, adică al sintezei diferitelor tipuri de acizi ribonucleici celulari (ARNm, ARNt, ARNr);

4. În toate aceste cazuri de sinteză de catene polinucleotidice este utilizată o matriță *(template)*, reprezentată de o catenă polinucleotidică preexistentă, numită și **catenă-mamă** sau **catenă parentală**;

5. Secvența de baze azotate din fiecare catenă nou-sintetizată, numită **catenă-fiică** sau **replica** este complementară secvenței de baze azotate a catenei parentale pe care a copiat-o. Aceasta înseamnă că dacă este o adenină în catena parentală va fi adăugată o timină la capătul catenei–fiice în creștere, atunci când adenina este copiată.

Formula generală a sintezei ADN este:

$$\mathbf{(dNp)n\ dN_{OH} + dNTP \rightarrow d(Np)_{n+1}dN_{OH} + PP}$$

în care:

- (dNp)n dNOH reprezintă un polimer deoxiribonucleotid fosfat cu un grup terminal 3’-OH;
- -dNTP reprezintă un deoxiribonucleozidtrifosfat (deoxiribonucleotid);
- -PP reprezintă o moleculă de pirofosfat.

Noul nucleotid este adăugat la capătul 3’ al catenei în creștere asociat cu eliminarea unei molecule de pirofosfat. Grupul 3’-OH al noului nucleotid, recent adăugat la catena în creștere, funcționează ca primer pentru adiția următorului nucleotid ș.a.m.d.

Watson și Crick au propus un model de replicare a ADN, cosiderând dublul-helix ADN ca un fermoar care este deschis la unul dintre capete, având loc separarea progresivă a celor două catene complementare, ceea ce permite să fie expuse succesiv bazele azotate din nucleotidele matrițelor, spre a se împerechea cu baze azotate complementare din nucleotidele libere. Devine astfel posibilă împerecherea fiecărei baze azotate din cele două catene matriță ale dublului-helix ADN cu baza sa complementară aflată în nucleotidele libere, urmată de includerea succesivă a nucleotidelor libere, adică adăugarea (incorporarea) nucleotid după nucleotid, în catenele-replică. Această complementaritate strictă de baze azotate determină ca fiecare catenă a dublului-helix ADN să funcționeze ca matriță sau model, formându-se pe baza fiecăreia dintre ele câte un duplex ADN, în care o catenă este veche (**matriță**), iar cealaltă este nou-sintetizată (**replica**).

Acest model de sinteză a ADN în care dintr-o moleculă-mamă, dublu helicoidală rezultă două molecule fiice de ADN bicatenar s-a numit *model semiconservativ* și implică patru predicții:

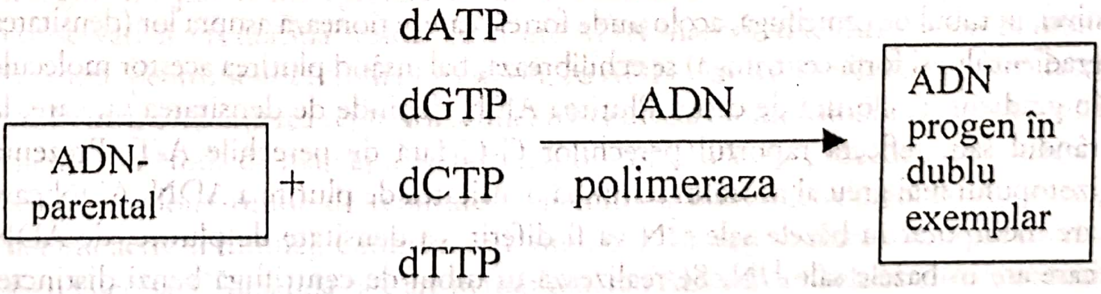
1. moleculele fiice trebuie să aibe aceeași secvență de nucleotide pe care a avut-o molecula parentală originală;

2. fiecare moleculă-fiică trebuie să conțină o catenă polinucleotidică parentală și o catenă polinucleotidică nou-sintetizată;

3. deoarece separarea celor două catene ale moleculei ADN parentale inițiale nu se realizează dintr-o dată, pe toată lungimea ei, ci ea este progresivă, după cum și sinteza replicilor are loc progresiv, prin adăugare de nucleotid după nucleotid, în cursul desfășurării replicării ADN, trebuie să apară o bifurcație de replicare;

4. în cursul replicării, genele aflate la punctul de start al replicării trebuie să fie prezente într-un număr dublu de exemplare, față de cele de la celălalt capăt al moleculei, încă nereplicat.

PRIMA PREDICȚIE, potrivit căreia moleculele fiice au o compoziție în nucleotide identică cu molecula parentală originală, poate fi testată prin sinteza in vitro, în sisteme acelulare, utilizând enzima identificată și purificată de Arthur Kornberg, în anii '55 ai secolului XX, numită *enzima lui Kornberg* sau *ADN-polimeraza I.* Aceasta a fost considerată a fi enzima care catalizează reacția de replicare:



Această reacție se poate desfășura numai dacă se utilizează nucleotide sub formă de trifosfați. Cantitatea totală de ADN la sfârșitul reacției poate fi de 20 de ori mai mare decât ADN inițial, utilizat ca amorsă, astfel că cea mai mare parte a ADN prezent la sfârșitul reacției este de tip ADN progen. Raportul G+T / A+T în ADN nou-sintetizat este identic cu acela din ADN amorsă, indiferent care a fost raportul cantitativ dintre dATP, dGTP, dCTP, dTTP introduse în potul de reacție.

A DOUA PREDICȚIE statuează că o moleculă –fiică de ADN va conține o catenă polideoxiribonucleotidică parentală și una complementară, nou-sintetizată. Abordată teoretic, această predicție presupune trei variante prin care un ADN parental poate fi legat de moleculele sale fiice. Aceste variante ipotetice de replicare a ADN pot fi:

a). modelul Watson-Crick(replicarea semiconservativă);
b). modelul conservativ;
c). modelul dispersiv.

În anul 1958, Matthew Meselson și Franklin Stahl au efectuat un experiment la bacteria *Escherichia coli* prin care și-au propus să elucideze care dintre aceste modele este cel real. Celulele bacteriene au fost crescute pe un mediu ce conține izotopul greu al azotului (^{15}N), încorporat în clorura de amoniu (NH_4Cl), forma normală a azotului fiind ^{14}N. Izotopul ^{15N} este inclus în bazele azotate în cursul sintezei acestora, cât timp bacteria crește pe mediu cu ^{15}N. După multe generații de creștere pe mediu cu ^{15} N, bacteriile au ADN bine marcat cu ^{15}N. Celulele bacteriene sunt trecute apoi pe mediu cu ^{14} N și sunt analizate după o generație, după două generații sau după trei generații celulare, fiecare diviziune celulară fiind obligatoriu precedată de o rundă de sinteză de ADN. Se extrage ADN și se ultracentrifughează în gradient de CsCl, acest gradient prezentând cea mai mare concentrație de ioni (Cs^+ și Cl^-) la fundul tubului de centrifugă. Moleculele de ADN puse în această soluție- gradient de densitate sunt și ele împinse spre fundul tubului de centrifugă sub acțiunea forței centrifuge. Dar, pe când ele se deplasează spre fundul tubului de centrifugă, ele întâlnesc o concentrație din ce în ce mai mare de sare care face ca asemenea molecule de ADN să fie împinse înapoi datorită densității de plutire a ADN, astfel că în final ADN-ul se „așează" la un oarecare nivel, în tubul de centrifugă, acolo unde forțele care acționează asupra lor (densitatea gradientului și forța centrifugă) se echilibrează, balansând plutirea acestor molecule în gradient de clorură de cesiu. Plutirea ADN depinde de densitatea sa, care, la rândul său, reflectă raportul perechilor G-C față de perechile A-T. Prezența izotopului mai greu al azotului schimbă densitatea de plutire a ADN. ADN care are încorporat în bazele sale ^{15}N va fi diferit, ca densitate de plutire, de ADN care are în bazele sale ^{14}N. Se realizează în tubul de centrifugă benzi distincte:

ADN cu ^{15}N bandează spre fundul tubului de centrifugă, fiind „mai greu", pe când ADN cu ^{14}N, fiind „mai ușor", bandează spre deschiderea tubului de centrifugă. Când se analizează ADN sintetizat pentru o generație, la trecerea bacteriilor de pe mediu cu ^{15}N, pe mediu cu ^{14}N, se obține o singură bandă de ADN care are o densitate de plutire intermediară între ADN cu ^{15}N și ADN cu ^{14}N. Când se analizează ADN de la bacteriile crescute pentru două generații pe mediu cu ^{14}N, apar două benzi, una corespunzând ADN intermediar ^{15}N-^{14}N, alta corespunzând ADN „ușor" cu ^{14}N. Acest rezultat confirmă realitatea modelului semiconservativ de replicare și exclude celelalte modele prezumtive (conservativ și dispersiv).

În același an, 1958, Herbert Taylor a abordat verificarea acestui model de replicare, utilizând autohistoradiografia și folosind ^{3}H-timidina (timidină tritiată) în calitate de precursor al timinei. Radicelele de *Bellevalia romana* (2n=8) sau de *Crepis capillaris* (2n=6) au fost ținute în soluție de ^{3}H-timidină. Tritiul este izotopul radioactiv al hidrogenului și trasorul ce poate fi detectat autoradiografic. Celulele radicelelor s-au divizat mitotic, incorporând în ADN din cromozomii lor, în cursul fazei S (de sinteză), ce precede fiecare diviziune celulară, timidina tritiată. Radicelele au fost apoi spălate, spre a fi îndepărtată timidina tritiată, și transferate ulterior, pe un mediu „rece", neradioactiv, cu timidină nemarcată. Localizarea celulară a tritiului poate fi determinată autoradiografic. Pe măsură ce tritiul se dezintegrează, el emite particule β, adică electroni energetici, care impresionează un film sensibil la radiații.

Peste lamela microscopică a preparatului cu cromozomi se întinde o emulsie fotografică care este impresionată de radiația β-electronică, emisă prin dezintegrarea tritiului. După developare, locul unde radiația β a impresionat pelicula fotografică apare ca un punct negru numit *grain*. Sub un asemenea punct negru, în preparatul microscopic se află structura celulară în care a fost încorporată timidina tritiată. Se constată că asemenea structuri celulare sunt reprezentate de nucleii interfazici și de cromozomii vizibili în celulele aflate în diviziune. De fapt, aceasta este autoradiografia, adică procesul prin care structurile celulare radioactive își iau propiile imagini. După realizarea unui singur ciclu celular, în prezența trasorului radioactiv, cromozomii metafazici apar cu o cromatidă „rece", adică nemarcată radioactiv, și cu cealaltă cromatidă „caldă", adică marcată radioactiv. Asemenea imagini nu pot fi interpretate decât în lumina conceptului de replicare semiconservativă: cromatida „caldă" (care are ADN marcat cu tritiu) a servit ca model (matriță) pentru sinteza cromatidei surori, cu ADN nemarcat radioactiv, adică „rece".

Pentru evidențierea replicării semiconservative a cromozomilor se aplică actualmente o metodă de marcaj neradioactiv. În cadrul acestui procedeu, cromozomii realizează două runde de replicare în mediu cu bromodeoxiuridina, un analog neradioactiv al timinei. Cromozomii sunt apoi colorați cu fluorocromul Hoechst și cu Giemsa. Cromatida care are în duplexul său ADN în ambele catene ale acestuia incorporată bromodeoxiuridina (în acest caz timina a fost înlocuită bifilar, adică pe ambele catene complementare ale dublului helix al unei cromatide) se colorează mai puțin intens, decât cromatida la care doar o catenă a moleculei sale ADN conține bromodeoxiuridina, în locul timinei (substituție monofilară) și care se colorează normal, intens și uniform. Rezultă astfel așa numiții cromozomi harlechinizați, dovadă a realizării unui model semiconservativ de replicare a ADN, respectiv a funcționării unei cromatide a cromozomului metafazic ca model pentru sinteza cromatidei surori a acestuia.

A TREIA PREDICȚIE -realizarea unei bifurcații de replicare în cadrul desfășurării procesului de sinteză a ADN- a fost dovedită experimental, utilizând autoradiografia și microscopia electronică, de către John Cairns, în anul 1963. S-a realizat marcarea cromozomului bacteriei *E. coli* (un duplex ADN circular) cu timidină tritiată. S-au lăsat bacteriile pe mediu cu timidină tritiată, pentru mai multe cicluri de replicare. S-a extras ADN și a fost pus pe grile și s-a realizat autoradiografia și examenul la microscopul electronic. După un ciclu de replicare, în mediul cu timidină tritiată se pot vedea cercuri de puncte negre (electronodense). În cursul celui de-al doilea ciclu de replicare s-au evidențiat bifurcații de replicare.

În reacția de formare a bifurcației de replicare sunt implicate numeroase enzime: polimeraze, enzime de desfășurare (*unwindaze* sau *helicaze*), *topoizomeraze*, proteine de inițiere etc. În plus, sunt implicate și mici segmente de ARN, ca primeri, spre a realiza startul procesului de polimerizare.

A PATRA PREDICȚIE a modelului de replicare Watson-Crick admite că replicarea este secvențială și începe dintr-o origine constantă. În acest caz, ADN dintr-o cultură de *E. coli*, aflat în replicare, ar trebui să conțină mai multe copii ale genelor situate lângă originea replicării, comparativ cu acelea localizate la terminalul replicării. Confirmarea acestei preziceri înseamnă existența, într-adevăr, a unei singure origini a replicării, pe când neconfirmarea sa ar însemna existența mai multor origini ale replicării. Toshio Nagata (1963) a testat această prezicere utilizând o tulpină de *E. coli*, lizogenă pentru cei doi fagi diferiți: *fagul λ* și *fagul 424*. Acești fagi se integrează în cromozomul bacterian în situsuri diferite. Nagata a sincronizat replicarea acestor celule, prin filtrarea lor prin 18 straturi de hârtie de filtru. Cele care treceau aveau aproximativ aceeași dimensiune și, ca urmare, toate se aflau în același stadiu al ciclului celular. În momente diferite, el a luat câte un eșantion de celule sincronizate și le-a iradiat cu ultraviolete, spre a induce trecerea fagilor de la starea de integrare (lizogenă) la excizia profagilor și deci la ciclul litic.

El a recoltat apoi fagii eliberați și a măsurat proporția relativă a celor două tipuri de fagi. Dacă admitem că numărul fagilor eliberați este direct proporțional cu numărul profagilor originali, prezenți în cromozomul bacterian, atunci, acest raport va varia cu timpul de replicare. Dozele celor doi fagi au fost determinate prin inducerea ciclului litic în diferite perioade de timp și apoi prin numărarea particulelor fagice prezente în fiecare celulă. Datele obținute susțin realizarea unei replicări polarizate, pornită dintr-un punct fix de inițiere al cromozomului bacterian.

Dacă celulele eucariote sunt expuse foarte scurt timp la timidină tritiată (expunere pulsatorie — *pulse exposure*), după care li se administrează timidină obișnuită, neradioactivă (acest tratament se numește *pulse chase*) și se extrage ADN, autoradiografia acestuia relevă existența a mai multor regiuni aflate simultan în replicare, pe aceeași moleculă de ADN. Replicarea începe la mai multe situsuri aflate în același cromozom eucariotic. O situație identică se înregistrează atunci când se utilizează cromozomi politeni de *Drosophila*. Pe același braț cromozomal replicarea începe simultan la nivelul mai multor situsuri (benzi).

Când se realizează analiza autoradiografică a buclelor ADN bacterian, marcat radioactiv, se constată că distribuția *grain*-urilor nu este uniformă, concentrația acestora fiind cea mai mică în centrul buclei de replicare și crește spre capetele acesteia. Acest fapt este excelent demonstrat la ADN de *Bacillus subtilis*.

Dacă zonele cele mai puțin încărcate cu grain-uri sunt cele care se replică cel mai timpuriu, deoarece timidina tritiată încă nu a atins o concentrație ridicată în celulă, atunci rezultă că ADN este replicat bidirecțional cu două bifurcații de replicare care se deplasează în sensuri opuse, spre ambele capete ale segmentului aflat în replicare.

În anul 1966, R.B.Inman a elaborat un alt model experimental pentru testarea bidirecționalității. El a arătat că dacă ADN este tratat cu alcalii (pH mare) pentru scurt timp, atunci catenele ADN la nivelul regiunilor bogate în perechi A-T manifestă tendința de separare, înainte de a fi separate regiunile bogate în G-C. Acesta este procesul de denaturare parțială sau de topire parțială. Utilizându-se formaldehida, se împiedică reasocierea catenelor separate. Inman a observat un *pattern* înalt reproductibil de „*bubbles*" (ochiuri), de-a lungul moleculei de ADN. Acest model este denumit **harta denaturării.**

Inman a izolat structuri de ADN și a realizat hărți de denaturare ale acestora. Întâmplarea a făcut ca întotdeauna să constate că hărțile celor două segmente de lungime egală sunt identice. Dacă considerăm o anumită buclă de denaturare ca punct de referință, într-o moleculă de ADN, atunci modelele unidirecționale și cele bidirecționale de replicare a ADN conduc la predicții foarte diferite.

Modelul unidirecțional prezice că acea buclă trebuie să rămână la o distanță constantă față de originea de replicare (bifurcația fixă), pe când modelul bidirecțional prezice că distanța față de ambele bifurcații se va modifica. Rezultatele susțin modelul bidirecțional.

Replicarea bidirecțională apare atât în ADN linear cât și în ADN circular, fiind demonstrată la fagi, bacterii, drojdii și *Drosophila.*

În anul 1972, Lucien Caro a determinat numărul relativ de copii ale diferitelor regiuni cromozomale, în cursul replicării. El a început cu celule de *E.coli* lizogenice pentru λ și de tip F^-, selectând dintre acestea celule care erau, de asemenea, lizogene pentru alt fag: *Mu-1.* Fagul *Mu-1* este foarte neobișnuit, prin aceea că își poate însera ADN în orice situs din cromozomul bacteriei gazdă. Când se integrează în interiorul unui cistron, atunci are loc pierderea funcției acelei gene. Bacteriile lizogene pentru *Mu-1* în loci specifici pot fi recuperate și separate prin selectarea auxotrofilor pentru compușii corespunzători. Au fost separate mai multe tulpini de *E. coli* cu *Mu-1* integrat în diferite poziții ale cromozomului bacterian. Cu cât fagul *Mu-1* este mai aproape de originea replicării, cu atât vor fi mai multe copii de *Mu-1* față de profagul λ care se integrează într-un situs fix. Astfel, raportul numeric dintre acești doi profagi ar putea indica direcția de replicare.

În 1960, Paul Doty și Julius Marmur au descoperit fenomenul de denaturare-renaturare a ADN. Eficiența reasocierii (renaturării) reprezintă o măsură a similitudinii dintre două molecule diferite de ADN.

Această tehnică a fost utilizată de Caro și colaboratorii în realizarea hibridării ADN-ADN, prin extragerea de ADN din fagii maturi λ și *Mu-1,* denaturarea și fixarea acestuia pe filtre separate. Numărul mediu de copii de ADN de profag λ și *Mu-1* a putut fi stabilit prin adăugarea de ADN marcat, denaturat, extras din bacterii dublu-lizogene. Cantitatea de marcare (*label binding)* la fiecare filtru este o măsură a numărului de copii ale acelui profag din ADN bacterian, aflat în replicare. S-a constatat că raportul profagilor *Mu-1* / λ este cel mai mic când *Mu-1* este integrat în *trp,* și acest raport crește în ambele direcții de la *trp,* atingând maximum la situsul *ilv.* Acest rezultat este interpretat în sensul că replicarea începe la un punct fix, aflat lângă *ilv,* de unde pornește bidirecțional, în jurul buclei. Fiecare bifurcație de replicare se deplasează cu aceeași viteză, deoarece replicarea pare a se termina din ambele direcții în apropierea *trp,* care se află la 180° de la *ilv,* pe harta genetică.

Dovada genetică a replicării bidirecționale a fost adusă prin utilizarea tehnicii de reasociere (renaturare) a ADN. ADN a fost extras din fagi λ și *Mu-1* maturi, și denaturat și fixat pe filtre separate. Numărul mediu de copii ADN profagic λ și *Mu-1* a fost stabilit prin adăugarea ADN denaturat, marcat, din dublu-lizogeni. Cantitatea de marcaj ce se leagă la filtru este o măsură a numărului de copii genice profagice din ADN bacterian replicat, ținând cont de faptul că profagul *Mu-1* poate fi inserat în situsuri diferite în cromozomul bacterian.

Rezultatele arată că raportul profagilor *Mu-1*/ λ este cel mai mic atunci când *Mu-1* se inseră în locusul *trp* și crește în ambele direcții de la *trp.*

2. IPOTEZA REPLICONULUI

Indiferent dacă o celulă are un singur cromozom (cum este cazul celulei procariote) sau mai mulți cromozomi (cum este cazul celulei eucariote), întreg genomul trebuie sa fie replicat.

Unitatea din ADN în care are loc un eveniment individual de replicare se numește *replicon.* Fiecare replicon „ia foc", adică funcționează, o dată și numai o dată, în fiecare ciclu de replicare. Repliconul este definit prin posesia de către el însuși a elementelor de control care dirijează propia sa replicare. El are o **origine,** la nivelul căreia este inițiată replicarea, și un **terminal,** la nivelul căruia replicarea încetează. Originea este un element *cis-activator,* adică capabil de a afecta doar acea moleculă în care se află el. Repliconul la procariote conține și gena care codifică proteina reglatoare care declanșează replicarea cromozomului bacterian.

Cromozomul bacterian este un exemplu tipic de replicon. O genă structurală din cromozomul bacterian deține informația genetică pentru sinteza inițiatorului replicării. Acesta este o proteină complexă care interacționează cu un segment specific al cromozomului bacterian numit *replicator* sau *operator* al replicării, de la care pornește replicarea.

Odată începută, replicarea nu se mai oprește, până când nu are loc dedublarea cromozomului. Se poate deduce că însuși cromozomul, respectiv dublul-helix ADN, dirijează sinteza factorilor care intervin în desfășurarea propiei replicări-aceasta fiind latura autoreglabilă, cibernetică, a replicării în care „ ieșirile controlează intrările".

În procesul replicării *cromozomului bacterian,* are loc mai întâi sinteza unui situs de membrană, pentru atașarea cromozomului, în vederea replicării sale. Situsul de membrană are valoarea unui receptor specific, pentru un anumit segment cromozomal, adică pentru o anumită secvență de nucleotide din acesta. Se sintetizează apoi două proteine inițiatoare, una sensibilă la concentrații joase, cealaltă sensibilă la concentrații înalte de cloramfenicol, care pot bloca replicarea cromozomului bacterian. Totodată, are loc sinteza **ARN primer.** Toate aceste componente alcătuiesc un complex de inițiere care acționează asupra ADN, la nivelul situsului ce s-a atașat la membrana celulară direct sau prin intermediul unor structuri de tip mezosom, determinând inițierea replicării. Odată aceasta realizată, replicarea se continuă progresiv, de la originea replicării, la punctul terminus, până ce întreaga moleculă este dublată, moment în care sinteza ADN este oprită. La nivelul situsului de membrană se află cantonat complexul enzimatic al replicării numit *replisom,*

Funcționarea cromozomului bacterian ca replicon este dovedită de faptul că fragmente de ADN introduse într-o celulă bacteriană, prin conjugare sau prin transformare, nu se pot replica de sine stătător, dacă rămân libere în citoplasmă. În schimb, dacă prin crossing-over, acestea vor fi integrate în cromozomul celulei ele vor fi replicate (reproduse deci) odată cu replicarea întregului cromozom. Aceasta înseamnă că numai cromozomul bacterian, în întregul său, reprezintă o unitate organizată, care se comportă în replicare ca un sistem de-sine-stătător, unitate care a fost denumită de către Jacob, Brenner și Cuzin, *REPLICON*.

Celula bacteriană poate avea un al doilea sau mai mulți alți repliconi, reprezentați de plasmidele bacteriene.ADN viral este și el un replicon. Spre deosebire de cromozomul viral și cromozomul procariotelor, *cromozomul eucariotelor* este prin excelență o structură multirepliconică, iar proteina reglatoare poate fi codificată într-un alt replicon, fiind un element *trans-activator*.

Cromozomii eucariotelor sunt structuri complexe, în care ADN este permanent complexat cu proteine bazice de tip histonă. Replicarea cromozomului eucariot se realizează asincron, atât între diferiții cromozomi neomologi ai setului haploid de cromozomi, cât și la nivelul unuia și aceluiași cromozom. Sinteza ADN eucariot este cantonată doar într-o anumită parte a ciclului celular care s-a numit *faza S*. Eucromatina este replicată la începutul fazei S. Ultimul ADN care se replică în perioada S aparține heterocromatinei facultative. Dat fiind acest comportament al eucromatinei și heterocromatinei în replicare, se presupune că gradul de heterocromatinizare ar putea funcționa ca un mecanism de determinare al ordinii de replicare a repliconilor cromozomilor eucariotici.

Existența multiplilor repliconi la nivelul cromozomului eucariot a fost dovedită prin marcaj radioactiv, în experiențe de autoradiografie, precum și prin marcaj specific cu 5'-bromodeoxiuridină (5'BUdR). Marcajul radioactiv apare simultan pe mai multe sectoare ale cromozomului eucariot, separate de sectoare nemarcate radioactiv, neevidențiindu-se un marcaj uniform și progresiv de la începutul stadiului S și până la sfârșitul acestuia. Există câte două bifurcații de replicare per replicon, fiecare replicon având punctul său de inițiere al replicării, iar replicarea se realizează bidirecțional, cele două bifurcații de replicare migrând în sens contrar.

Segmentul de ADN nuclear, care reprezintă un replicon eucariot, are o formă liniară, nu circulară, cum are repliconul bacterian, plasmidic, unii repliconi virali, repliconii mitocondrial sau repliconul plastidial al celulei eucariote. Între repliconii unui cromozom eucariot, dispuși în tandem, pe macromolecula de ADN nuclear se află punctele de terminalizare a replicării, inițierea replicării având loc în centrul repliconului și continuând bidirecțional, spre capetele sale. Se știe însă că replicarea durează doar 6-8 ore, ceea ce înseamnă că replicarea macromoleculei de ADN din cromozomul eucariot are mai multe puncte de inițiere, acesta având mai multe unități de replicare (repliconi), de lungimi diferite, cu un comportament relativ independent în replicare. Fiind inițiată simultan în mai multe puncte de origine ale replicării din cadrul genomului, replicarea asigură sinteza unei cantități mari de material genetic, într-o perioadă restrânsă a ciclului celular.

Cantitatea mare de ADN a celulei eucariote este replicată într-un timp mult mai scurt, decât ar trebui, dacă se compară cu viteza de replicare de la procariote. Aceasta este consecința faptului că replicarea este inițiată la nivelul multiplilor repliconi ai cromozomului eucariot (fig. 1). Se admite că fiecare replicon este activat într-un anumit moment al fazei S, dar există cu certitudine o ordine a inițierii replicării, la nivelul acestor multipli repliconi. Unii repliconi sunt activi la începutul fazei S, alții în mijlocul acesteia, iar alții la sfârșitul acesteia.

Repliconii eucariotelor au între 40 Kb, la drojdii și diptere, și 100 Kb, în celulele eucariotelor superioare. Rata replicării este de 2000 pb/minut, pe când la bacterii, viteza de deplasare a bifurcației de replicare este de 50.000 pb/minut.

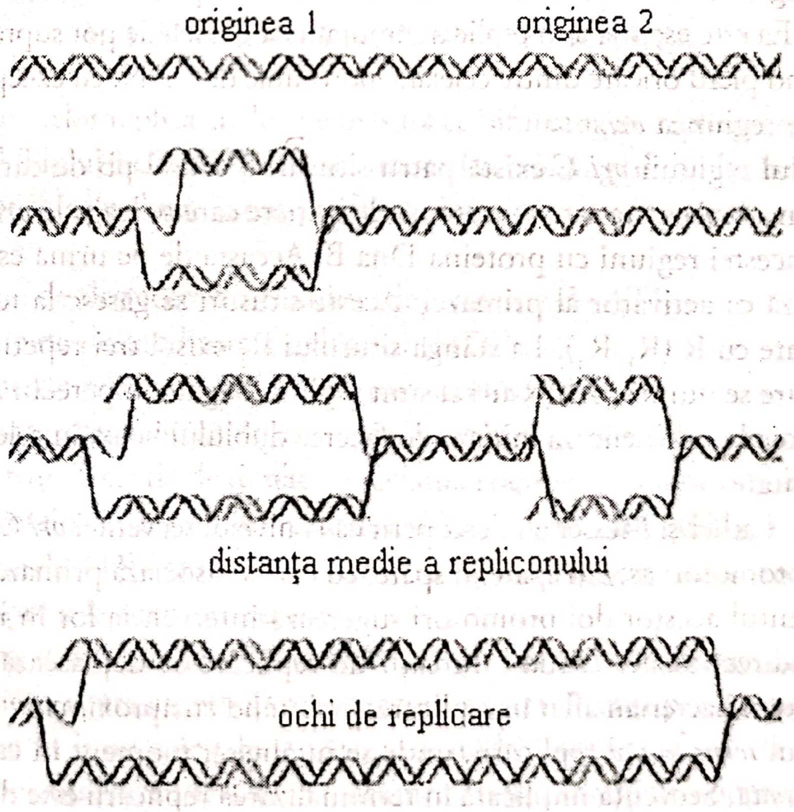


Fig. 1 — Asincronia în funcționarea repliconilor învecinați din ADN eucariot (după Lewin, 1997).

3. ORIGINEA REPLICĂRII

Inițierea replicării se face într-un punct de pe macromolecula de ADN numit originea replicării. La toate sistemele biologice analizate, regiunea unde se află acest punct prezintă o bogăție de perechi A-T, flancate de perechi G-C. La nivelul perechilor A-T are loc inițierea separării celor două catene, deoarece aceste perechi, având doar câte două punți de hidrogen, sunt mai ușor separate comparativ cu perechile G-C care sunt mai stabile, având trei punți de hidrogen între bazele complementar împerecheate. În cazul cromozomului bacterian, punctul de origine al replicării s-a numit *ori C.*

Secvența *ori* de la *E. coli* prezintă o mare omologie cu secvența *ori* de la fagul λ și fagul G_4. Ea are un grad înalt de repetitivitate, conținând secvențe cu bisimetrie rotatorie numite *palindroame,* pe seama cărora se formează împerecheri intracatenare de baze azotate care generează structuri în buclă numite *hairpin* (ac de păr) sau de forma unei frunze de trifoi (*clover leaf*) care pot fi recunoscute de către enzime și proteine specifice inițierii replicării. Îndeplinind aceeași funcție în replicare, regiunea *ori* este asemănătoare la sisteme replicative foarte îndepărtate filogenetic. Ea este esențială în replicare: mutantele de deleție pot supraviețui, chiar și atunci când pierd oricare dintre celelalte porțiunile de ADN, cu excepția porțiunii ce cuprinde regiunea *ori.*

La nivelul regiunii *ori C* există patru situsuri a câte 9 pb de care se atașează proteina Dna A. Aceasta este o proteină de inițiere care se leagă la *ori C* și asigură încărcarea acestei regiuni cu proteina Dna B. Aceasta de pe urmă este o *helicază* ce acționează ca activator al primazei. Aceste situsuri se găsesc la toți repliconii și sunt notate cu R (R_1-R_4). La stânga situsului R_1 există trei repetiții directe de cca 13pb care se numesc MER-uri și sunt regiuni bogate în perechi A-T. Acestea reprezintă locul unde helicaza inițiază desfacerea dublului helix, în cele două catene complementare.

În 1981, Lather și Messer au descoperit că la nivelul secvenței *ori C*, de la *E. coli*, se află doi promotori așezați spate în spate, cu care se asociază primaza. Localizarea și aranjamentul acestor doi promotori sugerează intervenția lor în inițierea unei replicări bidirecționale. Două bifurcații de replicare se deplasează de-a lungul cromozomului bacterian aflat în replicare, înaintând cu aproximativ aceeași viteză spre punctul *terminus* al replicării, unde se întâlnesc, moment în care replicarea este desăvârșită. Secvența implicată în terminalizarea replicării este denumit **situs terminator** *(ter).*

Orice moleculă de ADN care conține originea replicării se poate replica autonom în celulă. Bifurcația de replicare se deplasează secvențial de-a lungul duplexului ADN, din punctul START, de la nivelul originii replicării. La alte sisteme biologice, replicarea poate fi și unidirecțională.

În replicarea unidirecțională, o singură bifurcație de replicare se deplasează din punctul de origine al replicării spre punctul terminus, care trebuie să fie adiacent originii replicării.

În replicarea bidirecțională, la nivelul originii sunt formate două bifurcații de replicare, care se deplasează în direcții diametral opuse, spre punctul terminus care este situat diametral opus punctului de origine al replicării.

Dacă repliconii au formă circulară, ochiul de replicare conferă cromozomului forma literei grecești *theta*(θ). Orice segment de ADN poate fi replicat dacă este atașat la o origine de replicare. Se crează astfel un plasmid capabil de replicare autonomă, numai dacă ADN din origine conține secvența integrală necesară spre a se identifica pe sine ca origine autentică a replicării. Cele mai multe genomuri procariote au o singură origine a replicării per genom, pe când genomurile eucariote au un număr mare de asemenea origini de replicare.

4. TOPOLOGIA ADN ȘI REPLICAREA

Sinteza catenelor replică are loc pe măsură ce bifurcația de replicare se deplasează de-a lungul dublului-helix ADN. Desfășurarea (*unwinding)* dublului helix parental, spre a fi expuse cele două catene matriță, implică participarea a trei tipuri de proteine:

1. proteine de desfacere a helixului (dependente de ATP);
2. proteine de destabilizare a helixului (HDP);
3. proteine de relaxare a helixului (topoizomeraza I).

Prima dintre aceste proteine este aceea care separă catenele parentale spre a fi expuse ca matrițe. Reacția de desfacere reclamă energie oferită prin hidroliza ATP.

A doua proteină este o proteină de destabilizare a helixului (HDP) care se leagă la monocatene de ADN la nivelul bifurcației, spre a preveni reasocierea catenelor parentale și spre a le menține separate.

Desfacerea dublului helix parental fără o rotație corespunzătoare, creează superhelice (înfășurări superhelicale) precum separarea abruptă, bruscă a sforilor înfășurate una în jurul celeilalte, creează un nod în această sfoară, la punctul de separare. Topoizomeraza I relaxează tensiunea acestor înfășurări superhelicale, prin ruperea unei punți fosfodiesterice, într-una dintre catenele parentale, înainte de bifurcația de replicare. Se creează astfel o țâțână (*swivel point*) pe catena opusă, în jurul căreia are loc rotația liberă a catenei crestate și astfel este înlăturată superrăsucirea creată de separarea catenelor. Aceeași enzimă topoizomerazică reface puntea fosfodiesterică, după ce suprarăsucirea a fost înlăturată.

Lungimea considerabilă a duplexurilor ADN native, spiralizarea lor precum și circularitatea unora dintre moleculele ADN în stare nativă ridică probleme topologice complexe, în desfășurarea procesului de replicare.

Topologia duplexului ADN este deosebit de importantă în realizarea funcțiilor sale în replicare, transcriere, recombinare etc. Cum cele două catene complementare ale dublului helix ADN nu stau pur și simplu una în fața celeilalte, așa cum din rațiuni didactice sunt ele prezentate în unele modele grafice, ci ele se înfășoară plectonemical una în jurul celeilalte și ambele în jurul unui ax virtual comun, în vederea funcționării lor ca matriță, se impune desfășurarea lor în spațiu, printr-o reacție de desfășurare. Situația este complicată, mai ales în codițiile ADN circular covalent închis *(ccc)*.

Desfacerea unui dublu helix ADN în replicarea semiconservativă implică o problemă de mecanică: fiecare din cele două catene complementare ce se ramifică la nivelul bifurcației de replicare de forma literei *Y* trebuie să se desrăsucească una în jurul celeilalte sau porțiunea încă nereplicată trebuie să se rotească.

Molecula de ADN a cromozomului bacterian este de cca 1,3mm lungime, în circumferință, pe când celula de *E.coli* are 0,003mm. Rezultă că molecula de ADN bacterian este de cca 500 de ori mai lungă decât celula care o adăpostește. De aici decurge concluzia că această moleculă trebuie să fie pliată de nenumărate ori, din care cauză este exclusă mișcarea de rotație a tulpinii *Y*-ului. Singura soluție este aceea de a realiza o crestătură monocatenară într-una dintre catenele moleculei parentale, înainte de bifurcația de replicare care înaintează. Crestătura monocatenară realizată prin intervenția unei endonucleaze specifice numită inițial *nickază* (de la engl. *to nick* — a cresta), reprezintă de fapt crestarea adică ruperea unei punți fosfodiesterice din monocatena considerată.

După ce duplexul ADN se relaxează, crestătura monocatenară este anulată prin refacerea legăturii covalente, fosfodiesterice, și asigurărea continuității structurale a monocatenei.

Din nou intervine nickaza care crestează și apoi, după relaxarea regională a duplexului ADN, din nou intervine enzima de refacere a continuității covalente a monocatenei prin refacerea punții fosfodiesterice. Această enzimă s-a numit inițial *sealază* (de la engl. *to seal*- a coase, a suda, a reînoda, a reuni). Repararea crestăturii trebuie să aibă loc înainte ca bifurcația de replicare să treacă la nivelul crestăturii. Dacă această reparare nu are loc, o ramură a bifurcației de replicare este pierdută. Ulterior, s-a descoperit că atât funcția de **nickază** cât și aceea de **sealază** sunt îndeplinite de una și aceeași enzimă, numită *topoizomeraza I*.

Mai complicată este geometria moleculelor circulare de ADN, aflate în replicare. Aceste molecule iau în cursul replicării lor forma literei θ, numită încă *figura Cairns*, după numele autorului (John Cairns) care, în anul1963, a evidențiat asemenea figură, la cromozomul de *E.coli,* aflat în replicare. Prin tehnica autoradiografiei în microscopia electronică, s-a putut evidenția clar această formă tranzientă pe care o ia cromozomul bacteriei, aflat în replicare.

Problema desfășurării dublului helix în replicarea *theta* este formidabilă, deoarece o asemenea structură nu are capete libere, ceea ce face imposibilă rotația porțiunii nereplicate. Problema a fost rezolvată de John Cairns, prin propunerea funcționării unei crestături în avans, ce funcționează ca o țâțână, la nivelul originii replicării. Deși nu chiar corecte, aceste sugestii au anticipat descoperirea mecanismului corect, prin intervenția topoizomerazei.

Densitatea superhelicală reprezintă numărul de tururi superhelicale per tur de dublu helix ADN. Un tur superhelical apare atunci când duplexul ADN realizează o mișcare de revoluție în spațiu, în jurul propriei axe, fie în aceeași direcție în care este înfășurat dublul helix însuși și, în acest caz vorbim de *SUPERHELICARE POZITIVĂ*, fie în direcție opusă și, în acest caz, este o *SUPERHELICARE NEGATIVĂ*. Superhelicarea pozitivă „suprarăsucește" dublul helix, pe când aceea negativă îl subrăsucește (fig. 2).

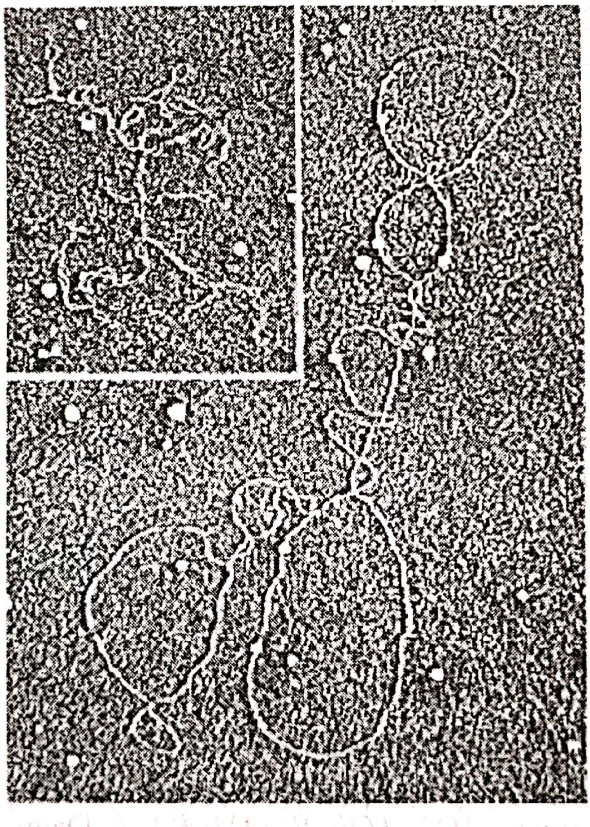


Fig. 2 — Înfășurări superhelicale într-un cromozom circular dublu-catenar. Sunt ilustrați doi cromozomi de la bactenofagul λ (după Lewin, 1997).

Numărul de lincări-*LINKING NUMBER*- definește de câte ori cele două catene ale dublului helix al unei molecule circulare se încrucișează. Acest număr reprezintă de fapt numărul de revoluții pe care o catenă le face în jurul celeilalte, atunci când ipotetic ADN este considerat a sta întins pe o suprafață plană.

Convențional, se consideră că numărul de *LINKS* reprezintă numărul de încrucișări din dreapta peste numărul de încrucișări din stânga, el fiind pozitiv pentru dublul helix dextral.

El are două componente: *TWIST* și *WRITE,*

$$L = W + T$$

Numărul twisting T este o proprietate în sine a dublului helix ADN, reprezentând rotația unei catene în jurul celeilalte, fiind determinat de numărul de baze pe tur de helice. Pentru un ADN circular închis, relaxat, ce stă întins într-un plan, *twist* este numărul total de perechi de baze, împărțit la numărul de perechi de baze per tur de helix. Astfel, T este numărul de tururi pe care le face un duplex ADN.

Numărul *writing* reprezintă înfășurarea axei unui duplex în spațiu. El corespunde conceptului intuitiv al superrăsucirii, dar nu are o aceeași măsură. Pentru o moleculă relaxată W=0 și, în acest caz, numărul deînlănțuiri *(links)* este egal cu înfășurările *(twist)*. Numărul de deînlănțuiri *(links)* este dat de formula:

$$\mathbf{L = W + T}$$

Numărul de înfășurări ca parametru de topologie a ADN este o proprietate invariantă a oricărei molecule circulare, individuale, de ADN. El este legat de evenimentele enzimatice reale, prin care se operează schimbări în topologia ADN. O enzimă care rupe o catenă sau catenele ADN, reorganizează relațiile lor în spațiu și apoi le reunește. Pe măsură ce replicarea celor două catene fiice se desfășoară de-a lungul helixului, în absența unui fel oarecare de desfacere a capetelor care nu cresc ale catenelor fiice, apare o supraînfășurare a porțiunii nereplicate a moleculei. Aceasta, la rândul său, va provoca o suprarăsucire pozitivă a sectorului nereplicat. Suprarăsucirea nu poate evident depăși o anumită limită, deoarece va deveni o barieră în calea înaintării bifurcației de replicare.

Acest impediment topologic ar putea fi evitat printr-un ciclu de crestare-sudare. Dar, de regulă, asemenea înfășurări ale structurilor circulare în replicare sunt pe o altă cale. Cele mai multe molecule native circulare de ADN sunt realizate negativ supraîncolăcite. Astfel, mișcarea inițială de supraîncolăcire nu constituie o problemă, deoarece ea poate fi rezolvată tocmai prin subînfășurarea existentă deja în supraspiralizarea negativă. Totuși, după ce cca 5% din structura circulară este replicată, superhelicarea negativă este epuizată și apar de acum probleme topologice.

Moleculele de ADN care sunt unele și aceleași, dar care diferă în numărul lor de înfășurări se numesc *IZOMERI TOPOLOGICI*. Enzimele care realizează interconversia acestor izomeri topologici se numesc *ADN-TOPOIZOMERAZE*. Denumirea aceasta a înlocuit alți termeni cu care inițial au fost descrise aceste enzime și anume pe cei de *ENZIME DE RELAXARE A ADN, SWIVELAZĂ, ENZIME DE DESRĂSUCIRE (UNTWISTING), ENZIME DE CRESTARE –SUDARE (NICKAZE- SEALAZE).* Unele topoizomeraze pot relaxa, adică pot îndepărta, doar superrăsuciri negative din ADN , pe când altele relaxează atât superrăsuciri negative, cît și pe cele pozitive. Unele topoizomeraze pot introduce superrăsuciri negative.

Topoizomerazele sunt încadrate în două clase, în funcție de mecanismele lor de acțiune:

1-*TOPOIZOMERAZE TIP I,* care acționează prin introducerea unei crestături într-una din catenele ADN (crestare monocatenеră). Enzima se leagă la o regiune în care duplexul ADN se separă in monocatene; apoi crestează o catenă, trage cealaltă catenă prin gol după care repară golul creat (fig. 3);

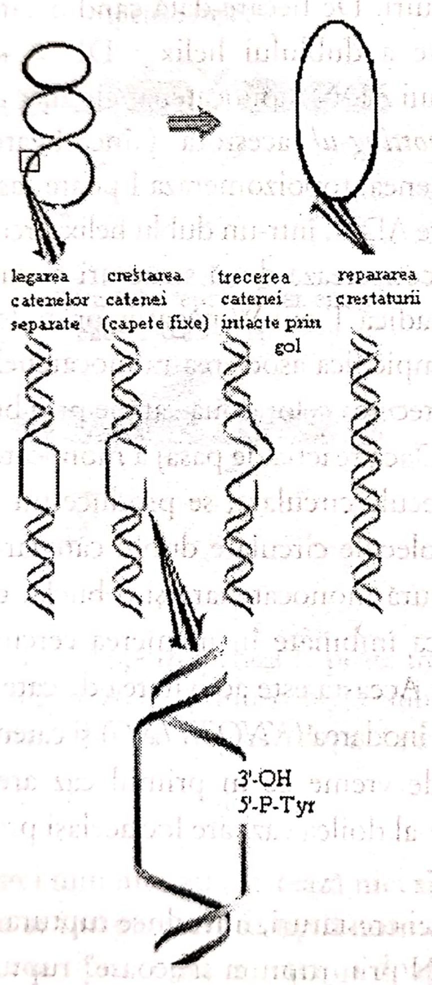

legarea catenelor separate
crestarea catenei (capete fixe)
trecerea catenei intacte prin gol
repararea crestaturii
3'-OH
5'-P-Tyr

Fig. 3 — Topoizomeraza I bacteriană recunoaște un segment de ADN suprarăsucit, îl „crestează“ și trece o catenă intactă prin bresa realizată în cealaltă catenă, după care se reface legătura fosfodiesterică (după Lewin, 1997).

2-*TOPOIZOMERAZE TIP II,* sunt enzime care acționează prin introducerea unei rupturi dublu- catenare. Cea mai bine este caracterizată topoizomeraza tip I de la *E. coli,* numită inițial *PROTEINA OMEGA (proteina* ω). Această enzimă relaxează ADN suprarăsucit înalt negativ, cu mare eficiență. Rata de relaxare devine mai înaltă, pe măsură ce numărul de înfășurări se apropie de acela al unui ADN complet relaxat.

Enzima nu acționează pe ADN superrăsucit pozitiv. Ea este codificată de gena *top.* Mutația acestei gene determină o creștere în nivelul superrăsucirilor din nucleoid și poate afecta transcrierea genică în general. Această enzimă are și alte activități pe ADN monocatenar, superrăsucirile negative având tendința de a stabiliza regiunile monocatenare care pot oferi substratul la care se leagă enzima

Enzima nu are capacitatea de a recunoaște o anumită secvență țintă, dar recunoaște situsuri neîntâmplătoare din ADN, fără a fi cunoscută natura unei asemenea preferințe.

Când topoizomeraza I de *E.coli* se leagă la ADN, ea formează un complex stabil în care o catenă a ADN a fost crestată și capătul său 5'-fosfat devine covalent lincat la un rest tirozină din enzimă, ceea ce sugerează mecanismul de acțiune al enzimei: aceasta transferă o punte fosfodiesterică din ADN la proteine, manipulează structura celor două catene ale ADN și apoi reunește capetele în catena originală. Transferul legăturilor din acidul nucleic la proteină explică cum poate funcționa enzima, fără a avea loc o necesitate energetică suplimentară. În acest caz, nu are loc hidroliza ireversibilă a punților, ci energia lor este convertită printr-o *REACȚIE DE TRANSFER ENERGETIC.* Enzima topoizomeraza I se leagă la o regiune în care duplexul ADN devine separat în catenele sale, apoi enzima crestează o catenă, împinge cealaltă catenă în golul creat și apoi sudează ruptura. Prin această „manevră“, este modificat numărul de înlănțuiri. De fiecare dată când o catenă este trecută prin crestătură în cealaltă parte a dublului helix : DL = + 1. Topoizomeraza I poate trece un segment al unui ADN monocatenar circular prin alt ADN monocatenar, conducând la *knotting-ul* acestora („încârligarea“, „înnodarea“ lor) sau la *catenarea* lor. De asemenea, topoizomeraza I poate „asista enzimatic“ renaturarea a două molecule circulare ADN, într-un dublu helix circular. Formarea unei regiuni dublu- catenare care conectează două structuri circulare trebuie să genereze o desfășurare echivalentă, adică T sau W negativ, oriunde, în fiecare cerc. În absența enzimei , aceasta ar împiedica asocierea monocatenelor.

Topoizomeraza I elimină tensiunea, prin trecerea celor două catene prin bucla formată de cealaltă în direcția opusă rotației. Dacă reacția de pasaj a monocatenei este realizată cu două părți ale aceleiași molecule circulare, se produce un nod (KNOT). Enzima poate acționa pe două molecule circulare dublu catenare de ADN, asigurând ca una să prezinte o crestătură monocatenară și o buclă, trece prin cealaltă, acestea devin i*nterlocking*, adică îmbinate în manierea cercurilor olimpice, rezultând o structură *CATENATĂ.* Aceasta este activitatea de catenare a ADN, exercitată de topoizomeraza I. Formal, înodarea (*KNOTTING*) și catenarea (*CATENATING*) sunt topologic similare, de vreme ce în primul caz are loc *interloking-ul* aceluiași cerc, pe când, în cel de-al doilea caz, are loc același proces, dar cu cercuri diferite.

În cazul catenării, enzima se leagă opus unei crestături, introduce ruptura prin bucla celeilalte catene, trecând duplexul ADN prin ruptură și „coase“ ruptura.

Proprietățile formale ale topoizomerazelor de tip I de la eucariote sunt similare celor ale enzimei de la *E.coli,* dar ele pot relaxa suprarăsuciri pozitive și negative.S-au descris și topoizomeraze de tip II, atât la procariote cât și la eucariote. Majoritatea relaxează atât superrăsuciri pozitive cât și negative, dar reacția este dependentă de ATP. Probabil, o unitate de ATP este hidrolizată, pentru fiecare eveniment catalitic. Reacția este mediată prin realizarea unei rupturi dublu-catenare, într-un duplex ADN și trecerea regiunii învecinate a celuilalt duplex prin acesta (fig. 4).

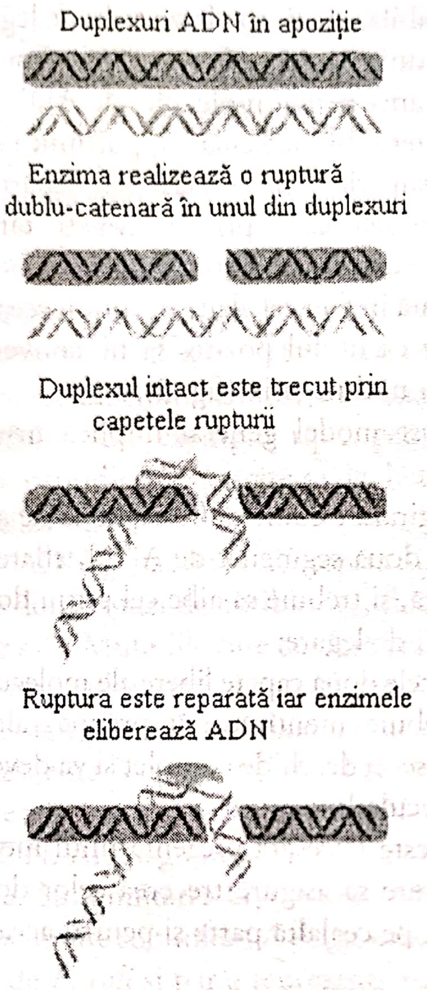

Duplexuri ADN în apoziție
Enzima realizează o ruptură dublu-catenară în unul din duplexuri
Duplexul intact este trecut prin capetele rupturii
Ruptura este reparată iar enzimele eliberează ADN

Fig. 4 — Topoizomeraza II poate trece un duplex ADN printr-o breșă dublu-catenară din alt duplex (după Lewin, 1997).

Activitatea topoizomerazelor poate fi folosită spre a realiza sau desface molecule circulare bicatenare catenate și molecule înnodate. Reacția reprezintă probabil o recunoaștere nespecifică a duplexului ADN la care enzima leagă oricare două segmente dublu-catenare care se încrucișează reciproc. Hidroliza ATP poate fi folosită spre a conduce enzima prin schimbări conformaționale care oferă forța necesară să împingă un duplex ADN prin ruptura creată în celălalt. Topologia ADN superrăsucit va fi de așa natură, încât superrăsucirile vor fi eliminate din structurile circulare. Cel mai bun exemplu de acest tip este topoizomeraza de tip II a fagului T_4 care reprezintă produsul a trei gene și a cărei activitate este esențială pentru replicarea ADN la acest bacteriofag. Din grupa topoizomerazelor II face parte și enzima ADN-giraza. Antibiotice precum coumericina, acid nalidixic, acid oscolinic și novobiocina inhibă ADN-giraza și, în consecință, sinteza ADN este blocată. La *E.coli*, s-a descris o mutantă rezistentă la aceste antibiotice și adăugarea lor la o cultură în creștere a acestei mutante nu afectează nici sinteza ADN, și nici superhelicarea acestuia, așa cum se înregistrează la tipul normal. Extragerea ADN–girazei de la tipul normal și de la tipul mutant arată că doar ADN-giraza extrasă de la tipul sălbatic leagă antibioticele. Două situsuri dintr-o moleculă circulară de ADN sunt aduse în contact de o singură moleculă de ADN-girază. Pentru aceasta, giraza răsucește molecula, producând un nod. Prin definiție, acesta este un nod pozitiv. Deoarece molecula este circulară și perechile de baze sunt cele mai stabile când mențin rotația lor la 12^0 una față de alta, în cadrul dublului helix, partea de jos a unei astfel de molecule aparent se înfășoară în sens opus, generând un nod negativ. Molecula

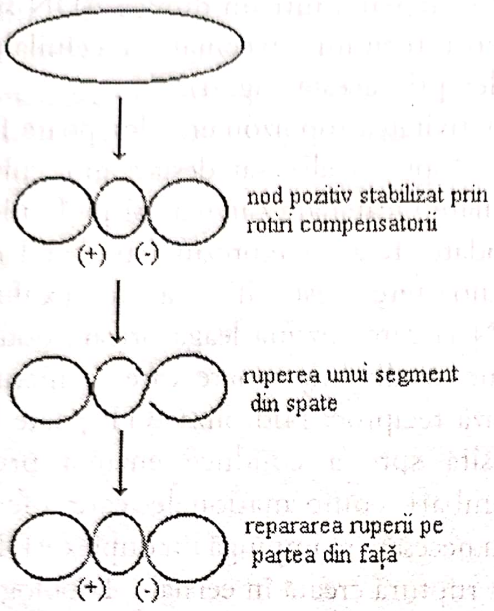

nod pozitiv stabilizat prin rotiri compensatorii
(+)
(-)
ruperea unui segment din spate
repararea ruperii pe partea din față
(+)
(-)

Fig. 5 — ADN giraza poate introduce superrăsuciri negative în duplexul ADN prin inversarea unei superrăsuciri pozitive (după Lewin, 1997).

va fi stabilă, cât timp giraza rămâne legată de nodul pozitiv. În acest moment, înfășurarea netă a moleculei de ADN va fi încă zero. În molecula III, porțiunea din nodul superior care este cea mai depărtată față de cel care privește va fi tăiată printr-o crestătură dublu-catenară și va fi deplasată în fața celeilalte porțiuni, ceea ce va face ca nodul pozitiv să fie convertit într-un nod negativ (fig. 5).

Acest model general implică următoarele:

1- giraza trebuie să fie capabilă de a se lega la două segmente de ADN, aflate la distanță, și trebuie să aibe cel puțin două situsuri de legare;

2- cele două capete libere ale moleculei III trebuie menținute împreună, altfel cercul se va deschide complet și va deveni o moleculă liniară;

3- este necesară prezența unui mecanism care să asigure trecerea celor două capete libere, de o parte a segmentului nerupt pe cealaltă parte și pentru această mișcare este nevoie de energie.

Prima cerință este satisfăcută de modul în care giraza se leagă la ADN. Molecula de ADN este înfășurată în jurul girazei, de o manieră asemănătoare, dar nu identică aceleia în care ADN se înfășoară în jurul octamerului histonic, din nucleosom. Această înfășurare aduce regiuni separate în condiția de apoziție

A doua condiție este îndeplinită de structură subunitară a enzimei. Giraza constă din patru subunități, două α și două β. Terminalul 5'-P al fiecărui capăt al moleculei II este covalent legat la o subunitate α. Acest lincaj are două efecte importante: în primul rând, cele două capete sunt atașate la o singură moleculă de girază și, ca urmare, ele nu pot să se despartă. În al doilea rând, energia câștigată prin tăierea punților fosfodiesterice este stocată la nivelul legăturii ADN-5'-giraza, astfel că nu este necesară nici o altă activare pentru a reuni capetele cu inversarea semnului.

Cea de a treia cerință este satisfăcută de faptul că monomerii β leagă ATP și această legare induce o modificare conformațională care are ca rezultat mișcarea celor două subunități, una față de cealaltă. Nu este necesară clivarea ATP pentru această mișcare , energia de legare fiind sursa de energie în acest caz. După reunirea capetelor rupte, ATP este hidrolizat spre a genera ADP și Pi. ADP care nu se leagă la giraza asigură desprinderea subunității β, ceea ce determină ca enzima să revină la conformația originală, gata să înceapă un nou ciclu și să introducă alte două înfășurări ale ADN circular.

În această reacție catalizată de giraza, spre deosebire de alte reacții metabolice, rolul ATP este foarte diferit, prin aceea că hidroliza sa servește mai curând spre a converti ATP legat la o moleculă care nu se poate lega la enzimă. Rolul ATP ca mediator al schimbărilor conformaționale ciclice se întâlnește în mai multe procese biochimice în care molecule sau părți din molecule se mișcă una față de cealaltă. Un exemplu tipic pentru acest proces este acela în care o catenă polipeptidică în creștere se deplasează de-a lungul ribozomului, în acest caz fiind utilizat GTP.

ADN-giraza de *E. coli* constă din două tipuri de subunități. Enzima este inhibată de două tipuri de antibiotice, fiecare acționând pe una din cele două subunități ale sale. Mutațiile care conferă rezistență la antibiotic identifică locii care codifică pentru subunități. Locusul *gyr A* este situat în zona în care apare prin mutație rezistența la acid nalidixic și la acid oxilinic. Locusul *gyr B* găzduiește gena pentru rezistența la coumericină A1 și novobiocină. Aceste antibiotice inhibă replicarea, ceea ce sugerează faptul că ADN–giraza este necesară pentru desfășurarea sintezei ADN. ADN-giraza activă are probabil structura A2B2 și o GM de cca 400.000 Da. Subunuitatea Gyr A are 105000 Da, iar Gyr B 95000 Da. La *E.coli* se află mai multe subunități A decât subunități B. Agregatele A se numesc topoizomeraza II de *E. coli* și par a reprezenta un component natural al celulei.

Giraza își leagă substratul său ADN în jurul exteriorului tetramerului proteinic. Giraza protejează cca 140 perechi de baze de ADN, față de digestia cu nuclează micrococală, ceea ce este foarte similar cu regiunea protejată de mult mai micul octamer histonic.

Modelul *INVERSĂRII SEMNULUI* pentru acțiunea ADN-girazei este bine cunoscut. Enzima leagă ADN într-o configurație de cross-over care este echivalentă cu o superspirală pozitivă. Aceasta introduce o superspirală compensatoare negativă în ADN nelegat. Apoi enzima rupe dubla catenă la cross-overul superspiralizării pozitive, trece celălalt duplex prin breșă, după care repară (sudează) breșa.

Ruperea și trecerea ADN prin molecula de giraza explică și reacția de *CATENARE* și *DECATENARE*.

O singură moleculă de ADN-giraza poate introduce cca 100 superrăsuciri per minut. Forma superspiralizată a ADN are o energie liberă mai mare decât forma relaxată și energia necesară spre a realiza conversia este oferită în urma hidrolizei ATP. În absența ATP, giraza poate relaxa superrăsucirile negative, dar nu și pe cele pozitive, la o rată cu mai mult de 10 ori mai încet decât rata de introducere a superrăsucirilor.

După intervenția topoizomerazei care determină relaxarea ADN, la nivelul originii de replicare intrevin enzime numite helicaze –ADN. Acestea realizează separarea catenelor prin ruperea punților de hidrogen, folosind energia provenită prin defosforilarea ATP, dependentă de ADN. Există și alternativa ca primul eveniment în separarea catenelor dublului helix să fie intervenția la punctul de inițiere al replicării aflat în originea replicării a unei endonucleaze care recunoaște în mod specific secvența de nucleotide de la nivelul acestei origini a replicării și produce o „crestare monocatenară“, adică o „tăiere“ a uneia din cele două catene , „tăiere „care nu este altceva decât desfășurarea unei legături covalente fosfodiesterice. În urma acestei crestări, rezultă două extremități, una având gruparea 3'-OH și alta având 5'-P. Energia liberă de la nivelul acestei crestări este suficientă spre a desface încă 2-3 punți de hidrogen. În acest caz, poate intra direct în acțiune ADN polimeraza. La *E.coli*, helicaza descrisă sub denumirea de *proteină Rep* se deplasează pe monocatena ADN în direcție 3'-5', îndepărtând catena complementară. O altă helicază numită *helicază III* se deplasează în direcția 5'-3' având o aceeași acțiune ca a proteinei Rep. Proteine neenzimatice denumite proteine **ssb** (de la *single-strand binding*) se leagă la monocatenele ADN denaturat fiziologic în vederea expunerii matrițelor în replicare și asigură stabilizarea monocatenelor. Odată atașate la monocatene, proteinele **ssb** nu mai permit reasocierea monocatenelor complementare, astfel că acestea pot funcționa ca matrițe.

După desfacerea structurii bicatenare în monocatene și stabilizarea monocatenelor la nivelul originii replicării, intervine primaza care determină sinteza unui scurt segment de ARN care s-a numit *ARN-PRIMER.*

5. INIȚIEREA REPLICĂRII

La bacteria *Escherichia coli*, inițierea sintezei noilor catene (replici) se realizează prin activitatea unui complex proteinic numit *PRIMOSOM*. În toate sistemele biologice, replicarea ADN este inițiată prin așa-numita primare- sinteza unui oligonucleotid numit ARN-primer care oferă ADN- polimerazei un capăt 3'-OH cu ajutorul căruia această enzimă atacă 5'-P nucleotidului aliniat pe matriță, la nivelul legăturii alfa (α), realizându-se prima legătură fosfodiesterică și inițiindu-se astfel procesul de replicare, adică de sinteză a catenei replică. În continuare, capătul 3'-OH al fiecărui deoxiribonucleotid adăugat este folosit de această ADN-polimerază spre a realiza etapa de elongare a replicii. Necesitatea oferirii unui capăt 3'-OH în inițierea replicării de către un primer ARN decurge din incapacitatea tuturor ADN-polimerazelor de a iniția sinteza „de novo" a unei catene polinucleotidice, având însă capacitatea de a alungi o catenă deja inițiată. Spre deosebire de ADN –polimeraze, ARN- polimerazele au capacitatea de a recunoaște secvențe specifice din ADN și de a iniția sinteza „de novo"(de a prima) a unei catene poliribonucleotidice . Neașteptata capacitate a moleculelor de ARN de a funcționa ca enzimă hidrolitică- *RIBOZIMĂ-* corelată cu necesitatea primării replicării ADN, printr-o componentă ARN, a condus la elaborarea uneia dintre cele mai interesante paradigme ale biologiei și anume: *ARN a fost prima moleculă ereditară, înzestrată cu proprietatea autoreduplicării.* Necesitatea complexificării sistemelor biologice, impusă de sensul progresiv al evoluției biologice, a determinat apariția a două crize informaționale care au fost rezolvate prin preluarea de către ADN a prerogativelor de moleculă informațională, deținătoare de informație genetică. Dublu-catenaritatea ADN și reactivitatea sa mai redusă față de ARN au conferit acestei semantide stabilitate și posibilitatea de a înscrie o cantitate mereu crescândă de informație ereditară, deoarece molecula de ADN poate să atingă lungimi incomparabil mai mari față de ARN. Sinteza replicativă, după principiul matriță-replică, asigură înalta fidelitate a procesului

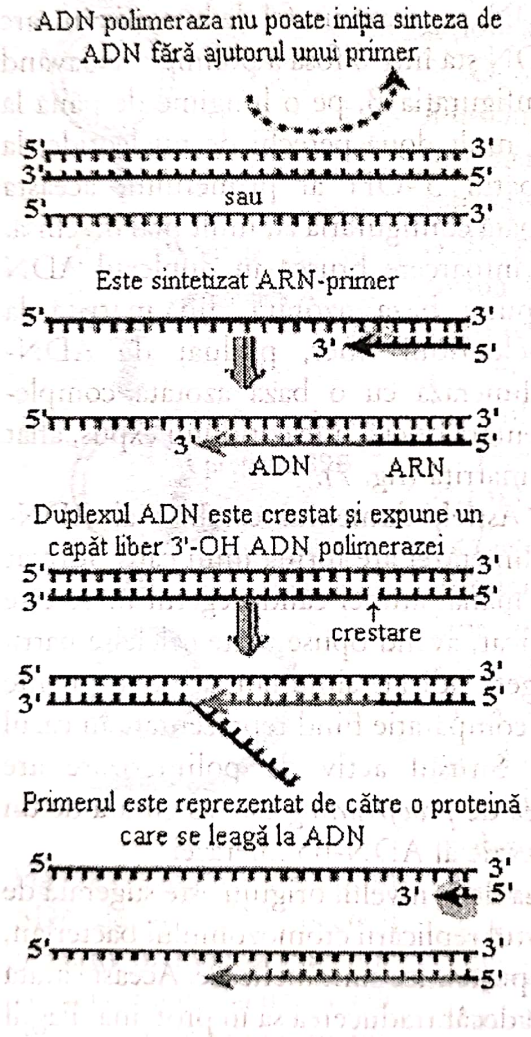

ADN polimeraza nu poate iniția sinteza de ADN fără ajutorul unui primer
5'
3'
3'
5'
sau
5'
3'
Este sintetizat ARN-primer
5'
3'
3'
5'
5'
3'
3'
5'
ADN
ARN
Duplexul ADN este crestat și expune un capăt liber 3'-OH ADN polimerazei
5'
3'
3'
5'
crestare
5'
3'
3'
5'
Primerul este reprezentat de către o proteină care se leagă la ADN
5'
3'
3'
5'
5'
3'
5'

Fig. 6 — Există trei căi prin care se poate forma capătul 3'-OH, necesar ADN polimerazei pentru a iniția sinteza ADN (după Lewin, 1997).

Există mai multe căi de realizare a primerului (fig. 6):

1- o secvență ARN este sintetizată pe matriță, astfel încât capătul 3'-OH al catenei ARN să poată fi extins de către ADN-polimerază;

2- capătul 3'-OH al unui ARN preformat este utilizat spre a prima sinteza ADN; această cale este utilizată de retrovirusuri spre a prima reverstranscripția ARN;

3- un terminal primer este generat în cadrul duplexului ADN, prin introducerea unei crestături monocatenare, așa cun este realizată în replicarea după modelul inelului rotativ. În acest caz catena preexistentă este îndepărtată de procesul de sinteză a catenei noi, dar nu este degradată, ca în cazul translației crestăturii;

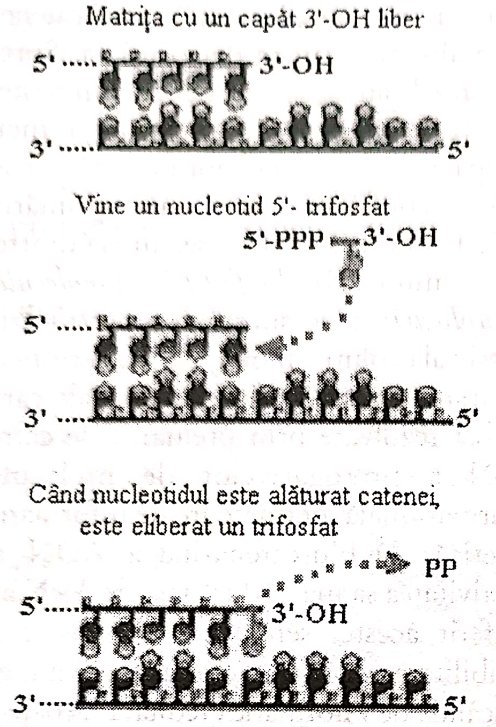

Matrița cu un capăt 3'-OH liber
5' .....
3'-OH
3' .....
5'
Vine un nucleotid 5'- trifosfat
5'-PPP
3'-OH
5' .....
3' ....
5'
Când nucleotidul este alăturat catenei, este eliberat un trifosfat
PP
5'.....
3'-OH
3'.....
5'

Fig. 7 — Sinteza de ADN se realizează prin adăugarea de nucleotide la capătul 3'-OH al catenei aflate în creștere, astfel încât catena nouă este sintetizată în direcție 5'-3'. Precursorul sintezei ADN este un nucleotid trifosfat, care pierde două grupări fosfat terminale în această direcție (după Lewin, 1997).

4- o proteină primează reacția direct, prin prezentarea (atașarea) unui nucleotid ce oferă ADN–polimerazei un capăt liber 3'-OH.

Reacția catalitică dintr-o ADN-polimerază are loc într-un situs activ în care un nucleotid trifosfat se împerechează cu un nucleotid complementar, dintr-o monocatenă ADN. Conformația ADN-polimerazei este de așa natură încât, atunci când aceasta se asociază cu matrița ADN, se crează un fel de buzunar în care ADN stă într-o fosă a polimerazei, având configurația B, pe o lungime de până la cel mult două perechi de nucleotide; la capătul 3'-OH al primerului, aceasta căpătă configurația A, mult mai deschisă. O întoarcere bruscă în duplexul ADN expune baza azotată din matriță la nucleotidul liber, preluat de ADN-polimerază cu o bază azotată complementară celei a nucleotidului expus, aflat în matriță (fig. 7).

Astfel, domeniul catalitic al ADN-polimerazei are forma unui căuș, format de mână, atunci când degetul mare este ridicat, având opuse toate celelalte patru degete ridicate simultan, aceste elemente de comparație fiind reprezentate în cazul enzimei de diferitele sale subdomenii. Situsul activ de polimerizare are corespondentul podului palmei. Activitatea de *proofreading* este asigurată de un situs activ, separat, din domeniul exonucleazic al ADN-polimerazei

Implicarea ARN-polimerazei în inițierea de la nivelul originii este sugerată de constatarea că rifampicina poate inhiba startul replicării cromozomului bacterian, într-un moment în care inhibitorii sintezei proteinice sunt ineficace. Aceasta arată că sinteza ARN în sine este mai importantă decât traducerea sa în proteină. Fagul λ reprezintă un sistem adecvat pentru studiul acestei probleme, deoarece originea sa susține replicarea bidirecțională și structura sa poate lua forma de frunză de trifoi, similară aceleia postulată pentru *E.coli.* Inițierea replicării ADN λ la nivelul originii necesită activarea prin transcripție.

Replicarea ADN la fagul λ nu poate fi inițiată, atunci când represorul este legat la operatorul de dreapta (O$_R$), deoarece legarea blochează începerea transcripției la nivelul promotorului de dreapta (P$_R$), tocmai ca aceasta să poată avea loc la nivelul originii. Transcripția inițiată la nivelul P$_R$ este necesară să activeze originea ADN λ. Necesitatea pentru sinteza ARN nu implică în mod necesar faptul că ARN oferă un primer pentru catena *leading*. Există alternativa ca sinteza ARN să fie implicată în realizarea unei schimbări structurale, în zona originii. Replicarea ADN de fag λ necesită produșii genelor fagice O și P, precum și mai multe funcții ale celulei gazdă. Proteina fagică O se leagă la originea replicării λ, pe când proteina fagică P interacționează cu proteina O și cu proteinele bacteriene. Originea se află în cadrul genei O, astfel că proteina acționează în apropierea situsului său de sinteză.

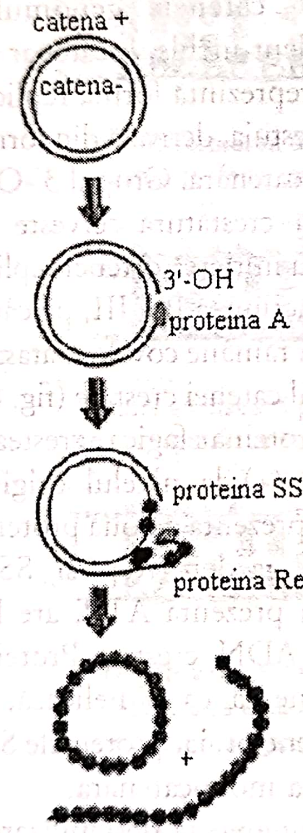


Fig. 8 — Forma replicativă ADN de fag φ X174 poate fi împărțit în monocatene prin efectul combinat al trei funcții: nickarea cu ajutorul **proteinei A**, desfășurarea cu ajutorul proteinei **Rep** și stabilizarea monocatenei cu proteine **ssb** (după Lewin, 1997).

O variantă a fagului ë, un derivativ desemnat *λdv* constă din genomuri mai scurte care însă poartă întreaga informație necesară pentru replicare, dar este lipsită de funcțiile de infecțiozitate, astfel că ADN *λdv* supraviețuiește în celula bacteriană sub formă de plasmide. Acest ADN poate fi replicat in vitro cu ajutorul unui sistem ce constă din proteinele O și P, codificate de fag, precum și din funcțiile replicative bacteriene.

Deoarece ADN-polimerazele necesită un primer 3'-OH, numai una dintre replici și anume catena *leading*, poate fi sintetizată continuu. Cealaltă catenă numită catenă *lagging*, este sintetizată discontinuu, fapt dovedit prin experiențe de tip *pulse-labelling*, adică de marcaj pulsatoriu, cu timidină tritiată. Dacă substratul radioactiv este prezent în contact cu celulele care își replică ADN doar pentru câteva secunde, înainte ca ADN să fie extras, din aceste molecule, cea mai mare parte a ADN nou-sintetizat, identificat prin radioactivitatea sa, se află sub forma unor piese mici, monocatenare, de numai 1000-2000 nucleotide lungime . Acestea au fost denumite **fragmente Okazaki**, în cinstea lui Reiji Okazaki, descoperitorul lor.

Prin studiul mutațiilor condițional-letale s-a putut face distincția dintre inițierea sintezei ADN și sinteza de ADN de la nivelul bifurcației de replicare.

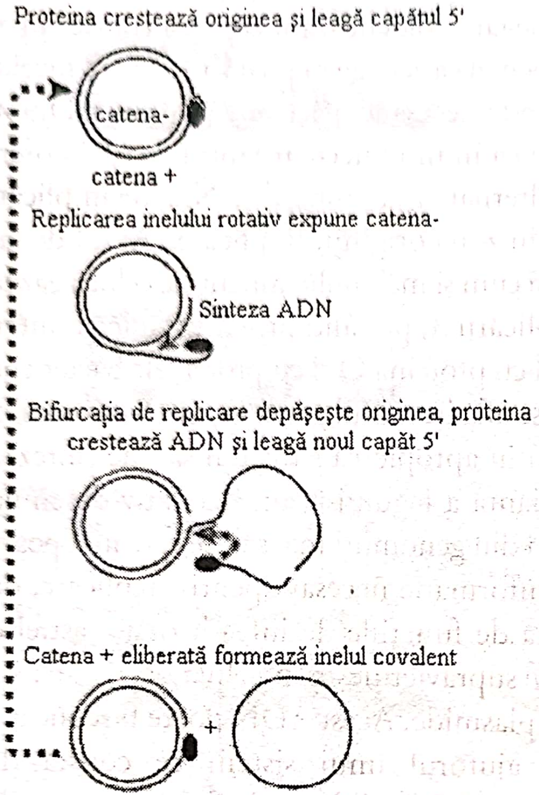

Proteina crestează originea şi leagă capătul 5'
catena-
catena +
Replicarea inelului rotativ expune catena-
Sinteza ADN
Bifurcaţia de replicare depăşeşte originea, proteina crestează ADN şi leagă noul capăt 5'
Catena + eliberată formează inelul covalent
+

Fig. 9 — ADN fagului φ X174 reprezintă o matriță pentru sinteza monocatenelor virale circulare. Proteina A rămâne atașată la ADN în timpul replicării, de fiecare dată crestând originea de pe catena virală (+) pe care o alătură capătului 5' nou format. În același timp, catena virală eliberată este circularizată (după Lewin, 1997).

Cele mai detaliate studii asupra inițierii replicării sunt efectuate la *fagul φX 174*. Proteina cistronului A (cis A) de *φX 174* este esențială pentru replicarea ADN al acestui fag. Originea replicării lui *φX 174* este tocmai în cistronul A. Proteina cis A este o endonuclează care desface o legătură fosfodiesterică la un situs specific, în secvența de nucleotide a uneia dintre catenele genomului circular covalent închis, bicatenar de *φX174* care reprezintă forma replicativă (RF) a acestuia, derivată din forma nativă, monocatenară. Grupul 3'-OH de la această crestătură servește ca primer pentru inițierea catenei replică *leading*, sub acțiunea Pol III, pe când proteina cis A rămâne covalent atașată la capătul 5' al catenei crestate (fig. 8).

Astfel, proteina fagică crestează catena virală (+) la nivelul originii replicării. În prezența a două proteine care aparțin gazdei (Rep și SSB) precum și în prezența ATP, are loc desfășurarea ADN crestat. Proteina Rep funcționează ca o helicază, în separarea catenelor, iar proteinele SSB mențin forma monocatenară.

O proteină de desfășurare a dublului helix și o proteină de destabilizare a dublului helix intervin secvențial și asigură replicarea, după modelul inelului rotativ, luând naștere o moleculă fiică dublu-catenară, circulară, cu proteina cis încă atașată și un cerc monocatenar de ADN de *φX174* complexat cu proteina destabilizatoare de helix. Proteina cis A are și o activitate de ligază specială care unește covalent capetele moleculei-fiice monocatenare, spre a forma un inel (fig. 9).

Și la fagul λ, gena O codifică pentru o proteină cerută în inițierea replicării ADN λ. Gena O conține, de asemenea, situsul de inițiere a replicării ADN λ. Asocierea unei proteine esențiale în replicare care recunoaște secvența de inițiere în cadrul propriei sale gene structurale este un fenomen general la procariote.

6. ELONGAREA REPLICILOR

Elongarea este realizată de către un complex de proteine numit *replisom*, asociat unei structuri particulare pe care ADN o capătă la nivelul bifurcației de replicare. Replisomul se deplasează de-a lungul matriței ADN, având loc desfacerea secvențială a dublului–helix, separarea catenelor complementare și sinteza catenelor-fiice (replici).

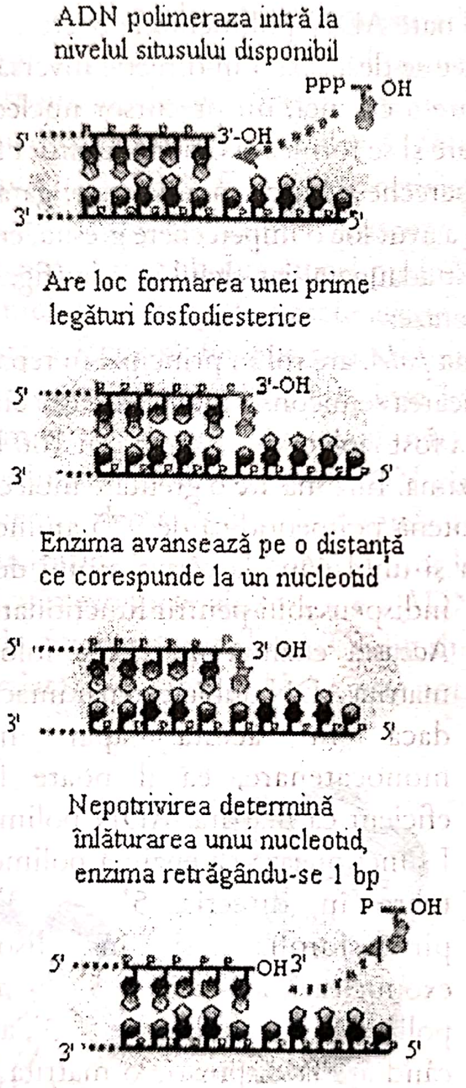

ADN polimeraza intră la nivelul situsului disponibil
PPP
OH
5'
3'-OH
3'
5'
Are loc formarea unei prime legături fosfodiesterice
5'
3'-OH
3'
5'
Enzima avansează pe o distanță ce corespunde la un nucleotid
5'
3' OH
3'
5'
Nepotrivirea determină înlăturarea unui nucleotid, enzima retrăgându-se 1 bp
P
OH
5'
OH 3'
3'
5'

Fig. 10 — ADN polimeraza bacteriană verifică perechea de baze din lanțul în creștere și excizează nucleotidul adăugat în cazul unei nepotriviri, adică al unei erori de includere sau al unei erori de împerechere (după Lewin, 1997).

Sinteza replicativă este realizată prin intervenția ADN–polimerazelor. ADN–polimerazele prezintă specificitate de direcție, nu însă și de secvență (nu recunosc o anumită secvență specifică de baze azotate din ADN). Alegerea substratului este determinată de matriță pe baza complementarității de baze. ADN–polimerazele bacteriene pot sintetiza în sisteme acelulare ADN animal, iar cele din celula animală pot sintetiza ADN bacterian. Utilizând o matriță reprezentativă de ADN monocatenar al fagului φ*X 174*, se sintetizează duplexuri ADN care, după denaturare termică, dau monocatene ce s-au dovedit biologic active, asigurând reproducerea de noi particule virale, în celula gazdă *E. coli* (Goulian și Kornberg, 1967).

ADN–polimeraza este eficientă în alungirea catenei inițiată prin sinteza primerului ARN. Acesta oferă ADN–polimerazei capătul său 3'–OH care este liber și care pătrunde într-un situs special al acestei anzime numit **situs pentru capătul 3'–OH al primerului**. ADN–polimeraza realizează în cadrul acțiunii sale catalitice condensarea, adică esterificarea grupei 3'–OH a primerului ARN cu grupa 5'-P a primului dNTP aliniat pe matriță, în virtutea complementarității sale cu baza azotată corespunzătoare din nucleotidul complementar din matriță. Legătura covalentă fosfodiesterică se realizează în urma unei reacții numită *atac nucleofilic* al hidroxilului din poziția 3' a unui nucleotid asupra legăturii macroergice dintre primul și cel de al doilea grup fosforic, din gruparea trifosfat a nucleotidului din imediata vecinătate. ADN-polimeraza catalizează acest atac nucleofilic.

Atât la procariote cât și la eucariote au fost identificate mai multe ADN-polimeaze, numite încă ADN replicaze. Toate ADN-polimerazele bacteriene au o activitate exonucleazică 3'-5', activitate ce se desfășoară în direcție inversă celei de sinteză a ADN. În procesul de elongare a catenei, un precursor nucleotidic este atașat la capătul catenei aflate în creștere și se formează o nouă legătură fosfodiesterică. Apoi, enzima se deplasează o pereche de baze mai departe, gata de a recruta un nou precursor nucleotidic. Dacă a avut loc o împerechere greșită, enzima se retrage, excizează ultima bază care a fost adăugată, iar ciclul se reia (fig. 10).

La *E coli* s-au descris trei ADN polimeraze:

ADN — polimeraza I, codificată de gena *polA,* are rol în principal în repararea leziunilor din ADN și rol secundar în replicarea semiconservativă. Această enzimă este numită încă *enzima lui Kornberg.* Ea a fost izolată din *E. coli:* din 100 kg de celule bacteriene s-au extras 0,6–1 g de enzimă. Enzima are o greutate moleculară de 109.000 Da și este alcătuită dintr-o catenă polipeptidică de 975 aminoacizi care prezintă o punte disulfidică precum și unul până la câtiva atomi de Zn, indispensabili pentru funcționarea ei. Această enzimă nu poate folosi ca matriță ADN dublu catenar intact, dar dacă în acesta apar incizii monocatenare, ea îl poate folosi eficient ca matriță. ADN-polimeraza I funcționează ca enzimă polimerizatoare în direcția 5' –> 3', în pirofosforoliză și în disociera exonucleazică 3'–>5' și 5' –> 3'. Ea polimerizează în direcție 5'-3', atunci când are la dispoziție o matriță și un primer. Enzima ADN-polimeraza I posedă activitate exonucleazică 5'-3', într-un alt centru activ, de pe suprafața sa. Pe baza acesor două caracteristici, ADN-polimeraza I poate realiza *NICK TRANSLATION* (fig. 11).

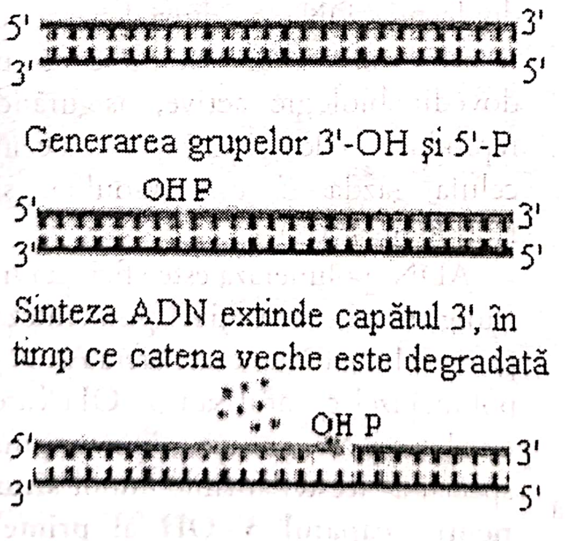

5'
3'
3'
5'
Generarea grupelor 3'-OH şi 5'-P
OH P
5'
3'
3'
5'
Sinteza ADN extinde capătul 3', în timp ce catena veche este degradată
OH P
5'
3'
3'
5'

Fig. 11 — Prin procesul de nick-translation, se înlocuiește un segment al unei catene preexistente dintr-un duplex ADN cu material nou sintetizat (după Lewin, 1997).

Atunci când ADN-polimeraza I purificată este pusă, in vitro, în contact cu o moleculă bicatenară de *φX 174* ce conține o crestătură $5'\text{-}PO_4 / 3'\text{-}OH$, într-una din cele două catene ale sale, și sunt disponibile în amestecul respectiv de reacție cele patru deoxiribonucleotide trifosfat, acțiunea combinată de polimerizare la capătul primer 3'-OH și scoaterea exonucleolitică a nucleotidului 5' adiacent deplasează crestătura de-a lungul cromozomului circular fagic. Această acțiune de translație a crestăturii continuă indefinit, până ce este epuizată rezerva de deoxiribonucleotide trifosfat sau este adăugată ADN-ligaza și NAD, spre a închide crestătura și a elimina 3'-OH-ul primer. Această translație a crestăturii a devenit un instrument de lucru extrem de util în Genetica moleculară, pentru marcarea radioactivă, in vitro, a sondelor ADN.

Tulpina 3478 de *E. coli* are o activitate ADN polimerazică aproape inexistentă, din care cauză s-a numit *mutanta pol* A_1. La această mutantă, activitatea polimerazică este abolită cu cel puțin 98%, deși nu afectează notabil capacitatea mutantei de a crește. Cu toate acestea, sinteza ADN se desfășoară cvasinormal. Aceasta a făcut să fie pus sub semnul întrebării rolul ADN polimerazei I, în replicare. Mutanta pol A_1 este însă foarte sensibilă la iradierea ultravioletă sau radiomimetică (metil metan sulfonat) de unde s-a tras concluzia că enzima Pol A este implicată în reparare. ADN polimeraza I este cea mai abundentă ADN polimeraza de la *E. coli*. Mutantele termosensibile în gena pol I au activitate exonucleazică 5' –> 3' abolită și sunt letale la t^0 restrictivă. De aici, s-a dedus că activitatea exonucleazică 5' –> 3' a ADN polimerazei I este esențială, fiind utilizată în îndepărtarea primerilor ARN din sinteza discontinuă a ADN, pe catena *lagging* (întârziată). Mutanta pol I A crește normal, dar fragmentele Okazaki sunt reunite cu întârziere, ceea ce sugerează că Pol I poate fi capabilă de a umple golurile create în urma exciziei primerilor din catena *lagging*, sub propria sa acțiune exonucleazică 5'-3'.

2. *ADN polimerază II* de *E. coli* are greutatea moleculară de 120.000 Da. Aceasta este o polimerază dependentă de ADN și asociată membranei celulare. Ea folosește ca matriță ADN bicatenar, cu incizii monocatenare și manifestă activitate exonucleazică 3'–>5', dar nu și activitate exonucleazică 5'–> 3'. Această enzimă implicată în repararea leziunilor induse de ultraviolete în ADN și umplerea golurilor din fragmentele ADN discontinuu sintetizate.

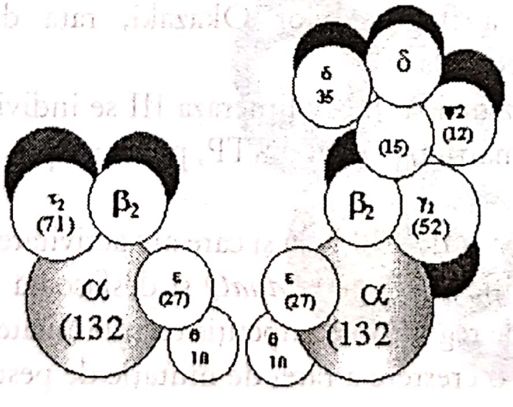


Fig. 12 — Schema ipotetică pentru asamblarea polipeptidelor în arhitectura asimetrică – dimerică a holoenzimei ADN polimerazei III. de *E. coli*.

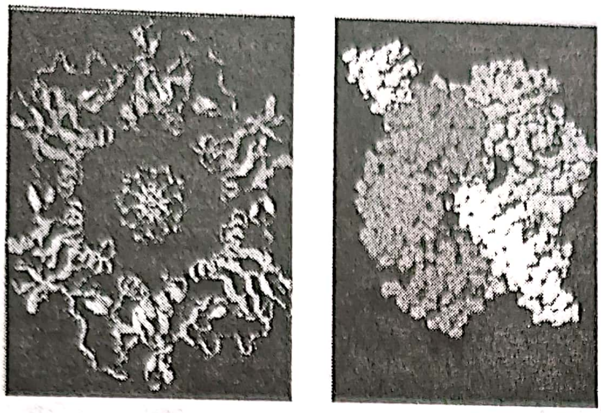


Fig. 13 — Subunitatea β_2 a holoenzimei ADN polimeraza III constă dintr-un dimer care formează un inel complet în jurul unui duplex ADN (localizat în centru).

A. secțiunea transversală printr-un duplex ADN înconjurat de enzimă; B. vedere laterală a modelului spațial (după Lewin, 1997).

3. *ADN polimerază III* este o proteină multisubunitară, ea fiind replicaza responsabilă de sinteza noilor catene (fig. 12 și 13). Dimerul β_2 înconjoară duplexul ADN, formând un fel de clamă „alunecoasă“ (*sliding clamp*) care permite holoenzimei să se deplaseze de-a lungul moleculei de ADN.

Această enzimă a fost identificată prin analiza mutațiilor condițional letale ale genei *dnaE* (la t^0 restrictivă manifestă un fenotip de încetare imediată a sintezei ADN sau de incapacitate de a iniția noi runde de replicare). De aici, s-a dedus că enzima este sintetizată sub direcția genei *dnaE.* Ea funcționează la nivelul bifurcației de replicare, spre a asigură sinteza de ADN, atât a catenei *leading* (conducătoare) cât și a catenei *lagging* (succesoare sau întârziată). Enzima este un complex enzimatic foarte mare și a fost identificată prin analiza mutațiilor de replicare ale bacteriei *E. coli* în gena *dna E.* Pe catena *lagging*, ea utilizează un precursor sintetizat de către o ARN polimerază, codificată de o altă genă vitală, desemnată *dnaG.* Enzima sintetizează ADN în direcția 5'–>3', necesitând primer, ioni de Mg^{2+} și cele 4 dNTP pentru reacția „in vitro“. ADN-polimeraza III este responsabilă pentru sinteza discontinuă a fragmentelor Okazaki, rata de polimerizare fiind de 2000 nucleotide pe secundă.

În cadrul structurii cuaternare a holoenzimei ADN polimeraza III se individualizează mai multe regiuni active: pentru matriță, pentru dNTP, pentru capătul primer.

Locusul *dnaE* codifică pentru subunitatea α de 130 Kda și care are activitatea de sinteză a ADN. Subunitatea ε este codificată de gena *dnaQ* și desfășoară o activitate exonucleazică 3`-5`, funcționând, de regulă, în competiție cu subunitatea α. Mutațiile în gena *dnaQ* sunt asociate cu o creștere a ratei de mutație de peste 10^3 ori.

Holoenzima ADNpolimeraza III este un ansamblu multimeric în care intră numeroase subunități (catene polipeptidice) diferite. Ea este foart înalt procesivă, cu potențial catalitic remarcabil ce asigură fidelitate mare a replicării. Holoenzima catalizează formarea de mai multe mii de punți fosfodiesterice înainte de a se desprinde de matriță, comparativ cu numai 20 de punți fosfodiesterice pe care le poate realiza ADNpolimeraza I. Așa se explică de ce aceasta de pe urmă nu poate realiza sinteza de fragmente Okazaki, ci doar umplerea unor goluri dintre acestea. ADNpolimeraza III adaugă 1000 nucleotide pe secundă, pe când ADNpolimeraza I adaugă doar 10 nucleotide pe secundă.

Holoenzima ADN polimeraza III constă în 10 tipuri de catene polipeptidice, având o masă moleculară de 900 kd, de aproape zece ori mai mare decât a ADNpolimerazei I. Holoenzima ADNpolimeraza III este un dimer care asigură replicarea simultană a ambelor catene-matriță ale unui dublu-helix ADN, aflat în replicare. Asimetria acestui dimer al ADNpolimerazei III (fig. 14) se asociază cu replicarea diferită, pe cele doua catene-matriță: o replică este reprezentată de catena **leading** cealaltă, de catena **lagging.** O ramură mai mică a dimerului este asociată cu matrița pe care este sintetizată catena **lagging**, pe când ramura mai mare este asociată cu matrița pe care se sintetizează catena **leading** (fig.15).

Subunitatea α este polimeraza, pe când subunitatea ε asigură **proofreading** exonuclezic 3'– 5'. Miezul fiecărei ramuri a holoenzimei este același și anume complexul $\alpha\varepsilon\theta$. Fiecare miez este catalitic, nu însă și procesiv. Procesivitatea este conferită de subunitățile β_2 și τ_2.

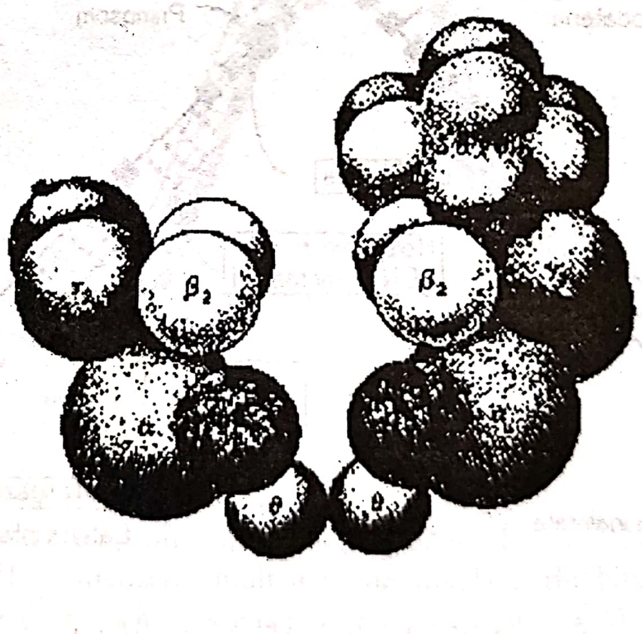


Fig. 14 — Arhitectura moleculara propusa a holoenzimei ADNpolimeraza III care este un dimer asimetric . Subunitățile catalitice (α), subunitățile exonucleazice 3'—5'(ε) și subunitățile porțiunii de alunecare (β_2) sunt redate prin sfere de diferite dimensiuni (după Kornberg și Baker, 1992).

Subunitățile β fac ca enzima să fie înalt procesivă prin încercuirea matriței ADN. Dimerul β_2 are forma unui inel stelat, cu o gaură interioara de 35Å diametru în care poate intra ușor un dublu-helix ADN. Spațiul este suficient spre a fi posibilă alunecarea enzimei pe dublul-helix ADN. O rată catalitică de 1000 nucleotide polimerizate pe secundă necesită o alunecare a 100 tururi de dublu-helix ADN (3400Å lungime sau 0,34μm) prin gaură centrala a β_2. Astfel, β_2 joacă un rol cheie în replicare, servind ca o pârtie de alunecare a ADN.

Holoenzima ADNpolimeraza III se află în bifurcație de replicare unde începe să sintetizeze catena **leading**, utilizând primerul ARN format de primază (fig. 15).

Duplexul ADN din fața polimerazei este desfăcut cu ajutorul helicazei dependente de ATP. Proteinele de legare la monocatena (*ssb*) țin catenele complementare ale duplexului ADN în stare separată (monocatene), acestea fiind întinse și accesibile spre a funcționa ca matrițe. Catena leading este sintetizată continuu de către polimeraza III, care nu părăsește matrița până ce nu o copiază complet. ADNgiraza introduce superrăsuciri negative dextrogire, spre a evita apariția obstacolelor topologice.

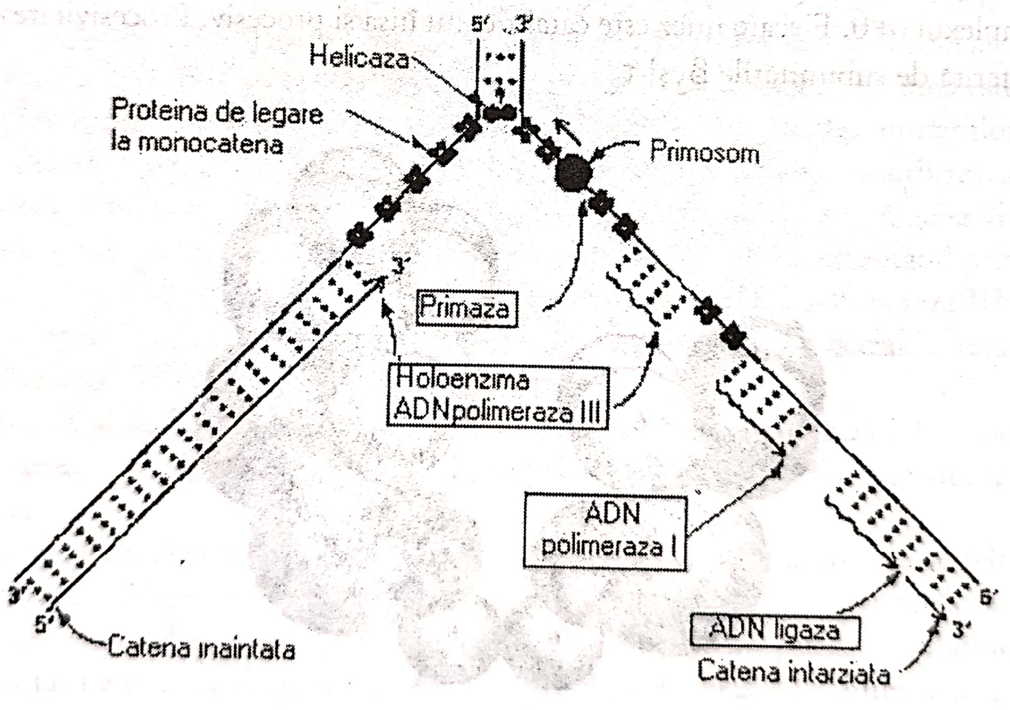

5'
3'
Helicaza
Proteina de legare
la monocatena
Primosom
3'
Primaza
Holoenzima
ADNpolimeraza III
ADN
polimeraza I
3'
5'
Catena inaintata
6'
ADN ligaza
3'
Catena intarziata

Fig. 15 — Schema evenimentelor enzimatice ce au loc la nivelul bifurcației de replicare la *E.coli.* Enzimele încadrate în dreptunghiuri catalizează inițierea, elongația și ligația fragmentelor Okazaki.
Liniile ondulate de pe catena **lagging** sunt primerii ARN (după Kornberg și Baker, 1992).

Sinteza catenei **lagging** este mult mai complexă. Ea este sintetizată pe fragmente, astfel că polimerizarea 5'–3' conduce la o creștere generală în direcția 3'– 5'. Acest lucru poate fi realizat prin plierea matriței pentru catena **lagging** (fig. 16).

Matrița pentru catena lagging va trece prin situsul polimerazei într-una din subunitățile polimerazei III dimerice, în aceeași direcție ca matrița catenei leading din cealaltă subunitate a dimerului asimetric al ADN polimerazei III. ADNpolimeraza III va trebui să permită trecerea matriței pentru catena **lagging** după ce aproximativ 1000 nucleotide au fost adăugate la catena **leading** . Apoi se va forma o nouă pliere înapoi a matriței pentru catena lagging și primaza va sintetiza din nou un scurt segment de ARNprimer, spre a se iniția formarea unui alt fragment Okazaki.

Golurile dintre fragmente Okazaki din catena lagging născândă sunt umplute de către ADNpolimeraza I. Această enzimă este esențială și prin activitatea sa exonucleazică 5'–3', prin care este înlaturat ARNprimer. Această activitate nu poate

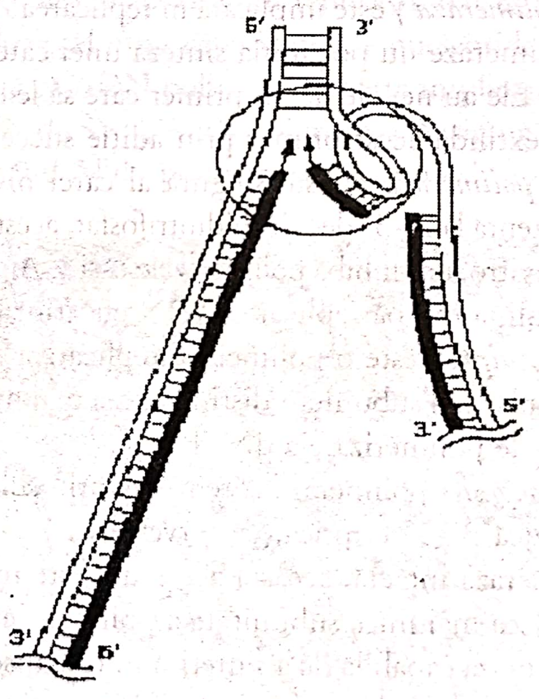


Fig. 16 — Plierea matriței pentru catena **lagging** dă posibilitatea holoenzimei dimerice ADNpolimeraza III să sintetizeze simultan catene-fiice, la nivelul bifurcației de replicare. Catena **leading** este redată ca linie neagră groasă și lungă în stânga, ARNprimer, în capătul liniilor groase mai scurte, din dreapta, reprezentând un fragment Okazaki complet (mai lungă) și altul în curs de sinteză (mai scurt). ARN primer este redat în negru, iar fragmentul Okazaki în gri-cenușiu. După repliere, și cel de al doilea fragment Okazaki va avea ARN primer orientat asemănător celui din fragmentul mai lung. (dupa A.Kornberg, 1992).

fi efectuată de către ADN polimeraza III, deaorece aceasta de pe urmă nu are capacitatea de editare 5`–3`.

În final, ADN ligaza reunește fragmentele Okazaki într-o catenă *lagging* continuă.

ADN polimerazele eucariotelor. Prima ADN polimerază eucariotă a fost descoperită în timusul de vițel, în anul 1960. Majoritatea ADN polimerazelor eucariote prezintă doar activitate de sinteză ADN, ceea ce este în contrast cu situația enzimelor similare de la bacterii care au o capacitate mai mare de acțiune, prezentând și activitate exonucleazică (*proofreading).* La eucariote există ADN polimeraze nucleare, mitocondriale și cloroplastice. ADN polimeraza nucleară este intens sintetizată înaintea fazei S, scăzând la sfârșitul acesteia. Deoarece ADN polimeraza nu are activitate exonucleazică, degradarea ARN primer se realizează de către RN-aza H.

Au fost indentificate mai multe tipuri de ADN polimeraze eucariote. *ADN polimeraza* δ este replicaza nucleară; *ADN polimerază* α este legată de inițierea replicării, iar *ADN polimerazele* β *și* ε sunt implicate în repararea leziunilor din ADN, pe când *ADN polimeraza* γ este implicată în replicarea ADN mitocondrial. Toate aceste ADN polimeraze nu pot iniția sinteza unei catene ADN, pornind de la nucleotide libere. Ele au nevoie de un primer care să le ofere un capăt liber 3`-OH și pot doar să extindă acest primer prin adiție succesivă de nucleotide, unul câte unul. *ADN polimeraza* $\alpha$ este singura al cărei nivel crește în cursul stadiului S. Ea este rezistentă la 2`-3` deoxitimidintrifosfat, acest analog neinhibând sistemele de replicare in vitro, dar inhibă polimerazele α și γ. Antibioticul de origine fungică numit aphidicolina inhibă replicarea ADN eucariot in vivo.

ADN polimerază α *(alpha)* este o polimerază replicativă majoră din celulele animale .Ea este alcătuită din 4 subunități distincte, cea mai mare având 180Kda, conținând situsul activ de polimerizare a dNTP.

La *Drosophila melanogaster* polimeraza α relizează prin subunitatea sa mare și o activitate exonucleazică 3`-5` criptică, ce servește ca *proofreading*, în cursul polimerizării. La polimeraza intactă, această activitate este mascată de o a doua subunitate de 70Kda. Cea mai mică subunitate a polimerazei α are aproximativ 50-60 KDa și este o primază capabilă de a sintetiza mici transcripte de ADN care servesc ca primeri pentru elongația subsecventă a catenei ADN, asigurată de subunitatea catalitică majoră. Astfel, ADN polimeraza α conține toate activitățile cerute de inițierea și sinteza replicilor, pe matrițe monocatenare. Dar, o asemenea polimerază nu este înalt procesivă, de vreme ce sunt polimerizate mai puțin de 100 nucleotide /eveniment de legare, în condiții obișnuite.

ADN polimeraza ε se distinge de ADN polimerază α prin aceea că ea conține o activitate exonucleozică 3`->5`, ușor detectabilă. ADN polimerază δ nu se asociază cu activitatea primazică. În prezența unei proteine de 37Kda, activitatea ADN

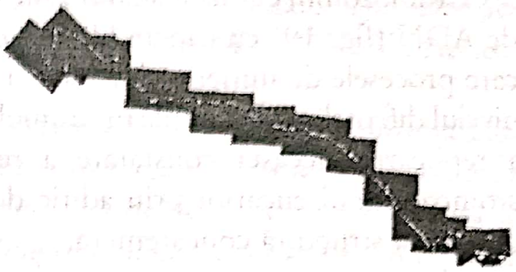


Fig. 17 — Autoradiografia unei molecule de ADN de la Drosophila melagonaster (după Kavenoff, R., L.C. Klotz și B.H. Zimm, 1974).

polimerazei δ diferă foarte mult. Această proteină este întâlnită în celulele proliferative și s-a numit *ciclina* sau *PCNA -proliferating cell nuclear antigen-* adică antigenul nuclear din celulele proliferative. În prezența PCNA, ADN polimerază δ devine mult mai procesivă, catalizând polimerizarea de mai mult de 1000 nucleotide/eveniment de legare; acest antigen nu are nici un efect asupra activității ADN polimeraza α, de unde s-a tras concluzia că cele două polimeraze sunt distincte biodinamic. În sistemele acelulare, PCNA este necesar pentru o replicare eficientă a ADN de SV_{40}. În absența PCNA are loc inițierea normală a replicării, la nivelul originii replicării, dar se sintetizează doar catene scurte, ce conțin doar cel mult câteva sute de nucleotide.

Aceste date arată că ADN polimerază α este implicată, alături de polimeraza α în replicarea ADN de SV_{40}; ADN polimeraza δ asigură polimerizarea pe catena conducătoare, pe când ADN polimeraza δ asigură sinteza catenei întârziate.

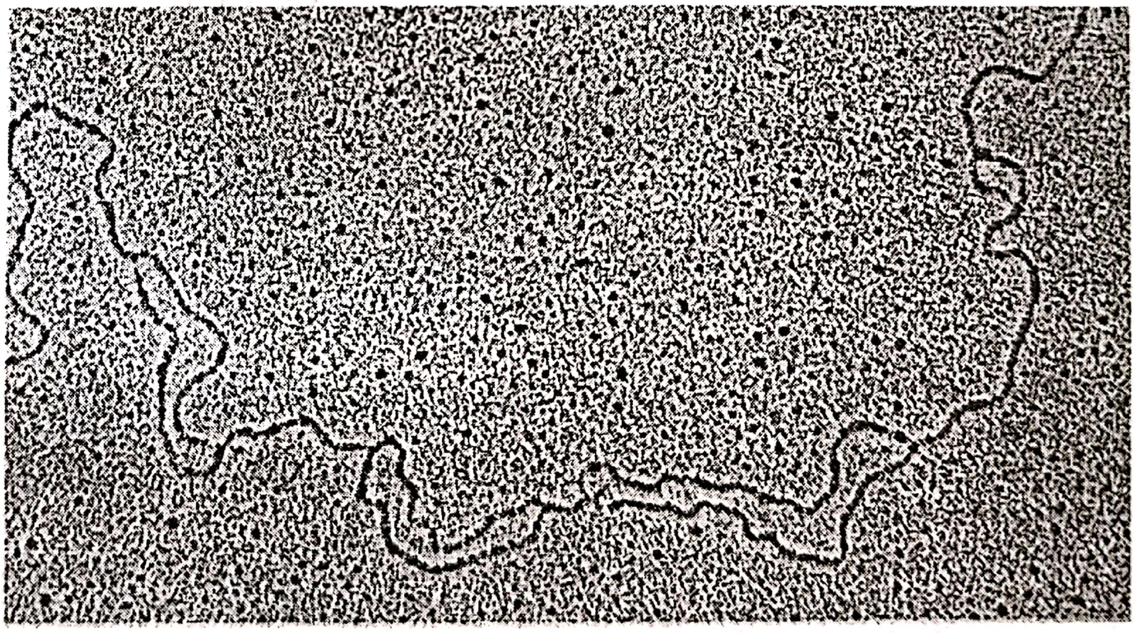


Fig. 18 — Imaginea electronomicroscopică a unei molecule ADN în replicare bidirecțională din nucleii aflați în etapa de clivaj, din dezvoltarea embrionului de *Drosophila*. Sunt prezenți mai multe bucle numite „ochi de replicare" (după Hogness, din Stryer, 1995).

Cromozomul eucariot adăpostește o singură macromoleculă bicatenară lineară de ADN (fig. 19) cu capete libere, reprezentând o unitate multirepliconică, în care procesele de inițiere, elongație și terminalizare sunt desfășurate asincron, la nivelul diferitelor sectoare ale macromoleculei ADN, fiecare având propria sa origine a replicării. Această constatare a reprezentat un argument pentru originea cromozomului eucariot prin adiție de multirepliconi de tip procariot, printr-o probabilă structură concatemeră.

7. SINTEZĂ REPLICATIVĂ ȘI SINTEZĂ REPARATORIE

În ultimii 10-15 ani s-a putut stabilii cu exactitate deosebirea dintre sinteza reparatorie a ADN și sinteză sa replicativă, realizată în vederea reduplicării genetice și continuității ereditare .

Sinteza reparatorie se realizează la nivelul unor regiuni scurte –cele afectate de leziuni- după un model dispersiv, în cadrul căruia are loc destrămarea catenei afectate. Sinteza replicativă implică însă întreaga moleculă de ADN, cu păstrarea integrității catenelor.

Erorile de împerechere sunt de ordinul aproximativ 10^{-3} pe pereche de baze replicată. Erorile apărute în procesul de replicare sunt erori de substituție și erori *frameshift*. În cazul erorilor de substituție o nucleotidă nepotrivită este încorporată ca urmare a unei împerecheri eronate de baze azotate. Nivelul de eroare este determinat de gradul de eficacitate a *proofreading*-ului. Mutațiile *frameshift* apar ca urmare a inserției unui nucleotid (erori de includere) sau a omisiunii (excluderii) sau deleției unui nucleotid; și acest tip de erori este în legătură directă cu procesivitatea replicazei, respectiv cu tendința ei de a rămâne pe o singură matriță, decât de a se disocia de aceasta și de a se reasocia. Acest aspect este deosebit de important pentru replicarea unui sector homopolimeric, la care poate evea loc alunecarea de replicare (*replication slippage*) , având loc modificarea lungimii întinderii homopolimerice.

Regula generală este că procesivitatea crescută reduce posibilitatea unor asemenea evenimente. În cazul ADN polimerazelor multimerice , procesivitatea este de regulă crescută de o substanță particulară care nu este necesară pentru activitatea catalitică în sine.

ADN polimeraza realizează scrutinul nucleotidelor ce vin spre a se împerecha cu cel complementar din matriță, prin recunoașterea specifică a caracteristicilor de potrivire chimică, acesta fiind **controlul erorilor presintetice**. ADN polimeraza poate scrutiniza împerecherea de baze, după adăugarea nucleotidelor la replică și acolo unde s-a realizat o includere eronată, ea înlătură nucleotida adăugată ultima dată. Acesta este controlul *proofreading* (corecția citirii).

Toate enzimele ADN polimerazice bacteriene au o activitate exonucleozică 3`-5` care se desfășoară în sens invers aceleia de sinteză a ADN (5'–>3'). Aceasta este funcția propriu-zisă de *proofreading*.

Dacă s-a comis o eroare, enzima se deplasează înapoi, excizând ultima bază care a fost adăugată și creind un situs pentru intrarea nucleotidului înlocuitor. Fiecare ADN-polimerază are o rată caracteristică de eroare care este redusă de activitatea sa de corecție a citirii. *Proofreading*-ul reduce rata erorilor din replicare de la 10^{-3} la 10^{-7}.

În timpul replicării, se formează o bifurcație de replicare, deoarece duplexul ADN nu-și separă cele două catene complementare de la un capăt la celălalt, spre a funcționa ca matrițe pentru sinteza replicilor. Separarea este progresivă și, pe măsura separării, are loc sinteza replicilor. Din cauză că o porțiune a dublului helix rămâne nedenaturată fiziologic, adică catenele sale sunt neseparate, iar în zona în care a fost inițiată replicarea , catenele complementare sunt separate, o asemenea moleculă de ADN aflată în curs de replicare capătă forma literei Y. Bifurcația de replicare se deplasează de-a lungul dublului helix și dispare în momentul terminalizării replicării.

MODELUL FERMOARULUI. Replicarea începe la un capăt al moleculei și se desfășoară secvențial spre capătul opus al acesteia, după modelul deschiderii

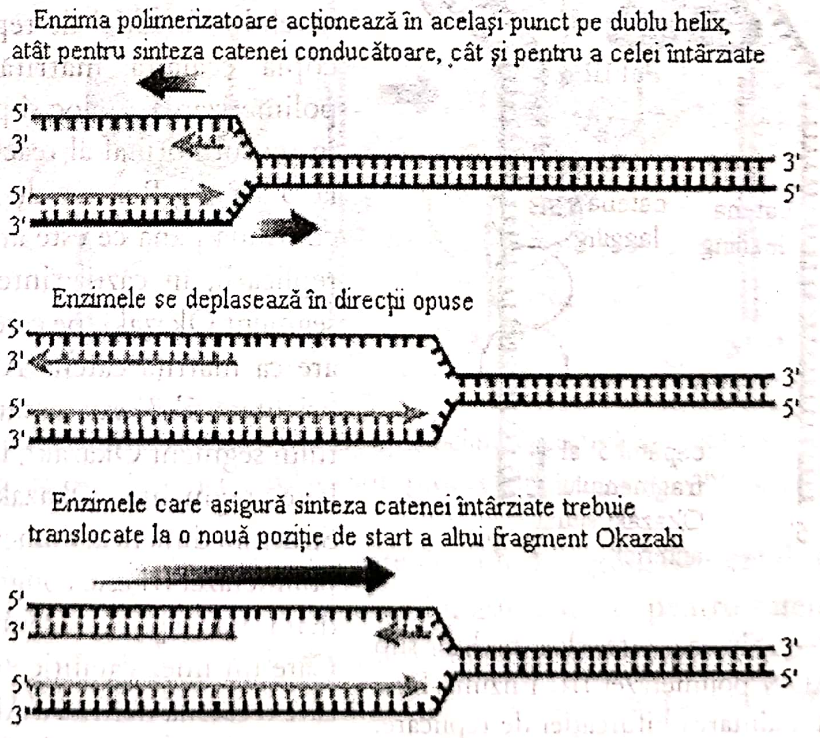

Enzima polimerizatoare acționează în același punct pe dublu helix, atât pentru sinteza catenei conducătoare, cât și pentru a celei întârziate
5'
3'
3'
5'
5'
3'
Enzimele se deplasează în direcții opuse
5'
3'
3'
5'
5'
3'
Enzimele care asigură sinteza catenei întârziate trebuie translocate la o nouă poziție de start a altui fragment Okazaki
5'
3'
3'
5'
5'
3'

Fig. 19 — Sinteza catenei conducătoare și a catenei întârziate (după Lewin, 1997).

unui fermoar. Inițial s-a considerat că noile catene cresc, începând de la capătul 3', pe o catenă și de la capătul 5', pe cealaltă catenă. Acest mod de replicare nu a fost confirmat în experiențele in vitro. În toate experiențele s-a dovedit că sinteza ADN utilizează un capăt 5' drept capăt începător și adaugă nucleotide, aliniate pe matriță, în virtutea complementarității cu bazele azotate din aceasta, la capătul 3'(fig. 20).

Sensul general de sinteză (replicare) a ADN este de la 5'-P la 3'-OH. Datorită acestei constatări a apărut dilema centrală a replicării semiconservative, generată de faptul că toate polimerazele descrise până în prezent catalizează reacția de polimerizare doar de la 5'-P la 3'-OH, având specificitate de direcție, deoarece ele se deplasează pe matriță doar în direcția de la 3' spre 5'.

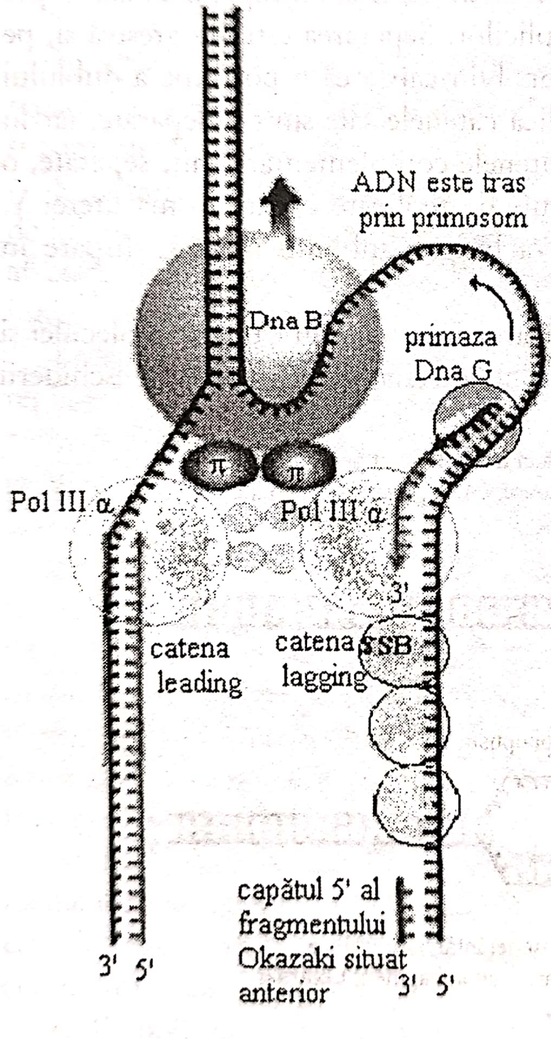


Fig. 20 — Sinteza cetenelor replică sub cataliza ADN polimerazei III. Enzima Dna B asigură înaintarea bifurcației de replicare, asigură trecerea ADN prin primosom (după Lewin, 1997).

Rezolvarea acestei probleme a fost adusă de către Barzilai și Thomas prin *„MODELUL CUȚITULUI ȘI FURCULIȚEI“*. Replicarea se realizează pe segmente scurte numite fragmente Okazaki. ADN- polimeraza III asigură sinteza catenelor pe ambele matrițe, pornind de la capătul 5'-3' pe o catenă și întorcându-se sau ,,sărind", la nivelul bifurcației de replicare spre a copia cealaltă matriță, astfel că, polimerizarea are loc și pe aceasta tot în sensul normal al reacției, adică de la 5' la 3'. Reacția de polimerizare continuă până ce este atinsă originea replicării, în cazul sintezei primului segment Okazaki, pe catena *lagging* ce are ca matriță catena ADN parental orientată 5'-3' sau capătul precedentului segment Okazaki, în cazul celorlalte segmente Okazaki (fig. 21). Structura dimerică, asimetrică, a ADN-polimerazei III este congruentă cu modelul de replicare semidiscontinuă. Câte un miez catalitic este asociat cu câte o catenă matriță a ADN, cel mare cu matrița pe care se sintetizează catena leading (sinteză continuă), cel mic cu

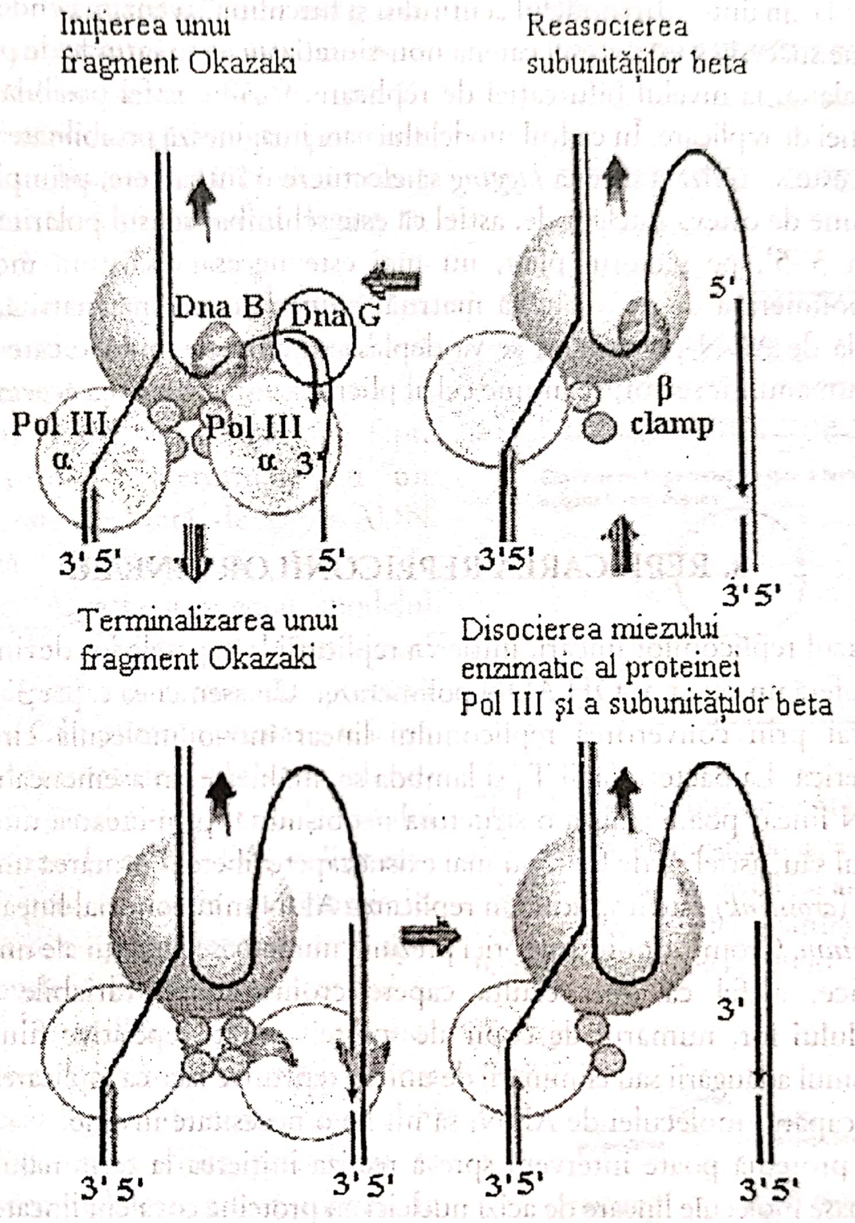

Inițierea unui fragment Okazaki
Reasocierea subunităților beta
Dna B
Dna G
Pol III
α
Pol III
α
3'
3' 5'
5'
5'
β clamp
3'5'
3'5'
Terminalizarea unui fragment Okazaki
Disocierea miezului enzimatic al proteinei Pol III și a subunităților beta
3'
3' 5'
3' 5'
3'5'
3'5'

Fig. 21 — Miezul enzimatic și subunitățile β disociază la completarea sintezei fragmentelor Okazaki și se reasociază la începutul acestui proces (după Lewin, 1997).

catena matriță pe care se sintetizează catena replică lagging (sinteză discontinuă). Holoenzima se deplasează continuu de-a lungul matriței pentru catena leading; matrița pentru catena lagging formează o buclă cu pliere înapoi, astfel că sensul deplasării ADN polimerazei să fie tot de la 3' la 5' și pe catena matriță ce are polaritatea 5'-3', iar polimerizarea să se facă, așa cum este normal și obligatoriu, de la 5' la 3'. Dna B separă catenele matriță și se deplasează de-a lungul ADN, în direcția „înainte“. În modelul „cuțitului și furculiței“ o enzimă endonucleazică intervine succesiv spre a cresta catena nou-sintetizată ce se întinde de pe o matriță pe cealalaltă, la nivelul bifurcației de replicare, făcând astfel posibilă înaintarea bifurcației de replicare. În cadrul modelului care imaginează posibilitatea ca matrița pe care este sintetizată catena *lagging* să efectueze o întoarcere, prin plierea sa pe o porțiune de câteva nucleotide, astfel că este schimbat sensul polarității sale din 5’-3’ în 3’-5’, pe sectorul pliat, nu mai este necesară săritura moleculei de ADN-polimerază de pe o catenă matriță, pe cealaltă catenă matriță, ci aceeași moleculă de ADN-polimerază se va deplasa sincron pe ambele catene-matriță. Pentru un anumit sector, și anume cel al plierii, acestea vor avea aceeași orientare fizică 3’-5’.

8. REPLICAREA REPLICONILOR LINEARI

În cazul repliconilor lineari, inițierea replicării la capetele lor devine posibilă, dacă se oferă un capăt 3’-OH ADN polimerazei. Un asemenea capăt 3’-OH poate fi generat prin convertirea repliconului linear într-o moleculă circulară sau multimerică. La bacteriofagii T_4 și lambda se întâlnește un asemenea mecanism.

ADN linear poate realiza o structura neobișnuită, prin crearea unui *hairpin*, la capătul său, astfel că de fapt, nu mai există capete libere. Formarea unui legături în cruce (*crosslink*) este implicată în replicarea ADN mitocondrial linear la ciliatul *Paramecium*. Cromozomii eucariotici prezintă numeroase repetiții ale unei secvențe telomerice, astfel că pot rezulta capete cromozomale variabile la nivelul terminalului lor, numărul de copii ale scurtei unități repetitive fiind variabil. Mecanismul adăugării sau eliminării de unități repetitive face ca replicarea integrală, până la capătul moleculei de ADN, să nu fie o necesitate în sine.

Și o proteină poate interveni spre a realiza inițierea la terminalul adevărat. Numeroase molecule lineare de acizi nucleici au proteine covalent lincate cu ultima baza de la terminalul 5’. Așa este cazul ADN al adenovirusului și al fagului φ29, precum și al ARN al poliovirusului. ADN al fagului φ29 și al adenovirusului se replică de la ambele capete, utilizând mecanismul îndepărtării catenei. Aceleași evenimente pot apare independent, la oricare capăt. Sinteza unei noi catene începe la un capăt, prin îndepărtarea catenei omoloage, împerecheată anterior cu matrița, în cadrul duplexului ADN. Când bifurcația de replicare atinge celălalt capăt, catena îndepărtată este eliberată ca o monocatenă liberă (fig. 22). Aceasta este apoi replicată independent. Pentru aceasta este necesară formarea unei origini dublu-catenare, prin împerecherea de baze între unele secvențe scurte, complementare, aflate la capetele moleculei.

La numeroase virusuri care utilizează asemenea mecanisme, se întâlnește o proteină covalent atașată la fiecare capăt 5'. În cazul adenovirusului, o proteină terminală este lincată la ADN viral matur printr-o punte fosfodiesterică legată la serină (fig. 23).

Proteina terminală are un rol dublu: ea poartă un nucleotid cu citozină (citidina) care reprezintă primerul și tot ea se asociază cu ADN polimeraza. De fapt, legătura proteinei terminale cu un nucleotid este realizată de către ADN polimerază în prezența ADN de adenovirus. Aceasta a sugerat modelul prezentat în figura 24. Complexul polimerază-proteină terminală, purtând nucleotidul C implicat în primare, se leagă la capătul moleculei ADN a adenovirusului. Capătul 3'-OH al nucleotidului C este utilizat de către ADN polimeraza pentru a prima reacția de elongație, generându-se o nouă catenă al cărei capăt 5' este covalent lincat la nucleotidul C inițiator. În realitate, reacția implică îndepărtarea proteinei de ADN, mai curând decât legarea de novo. Capătul 5' al ADN de adenovirus este legat la proteina terminală care a fost utilizată în ciclul precedent de replicare. Proteina terminală veche este îndepărtată de către proteina terminală nouă, pentru un nou ciclu de replicare. Proteina terminală se leagă la regiunea localizată între a 9-a și a 18-a pereche de baze, de la capătul ADN. Regiunea adiacentă, dintre pozițiile 17 și 48 este esențială pentru legarea unei proteine din celula gazdă, numită *factorul nuclear I*, și care este cerută de asemenea,

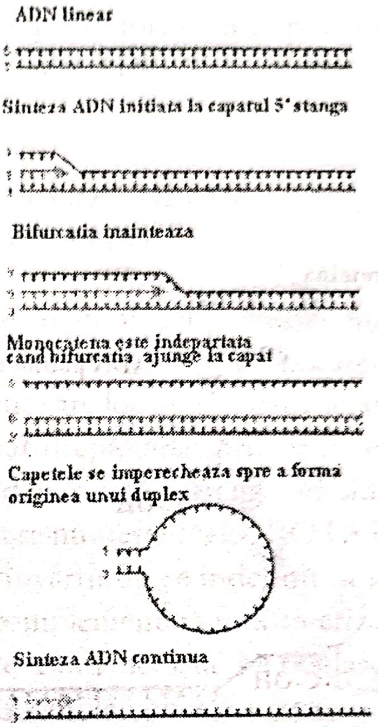

ADN linear
Sinteza ADN initiata la capatul 5' stanga
Bifurcatia inainteaza
Monocatena este indepartata cand bifurcatia ajunge la capat
Capetele se imperecheaza spre a forma originea unui duplex
Sinteza ADN continua

Fig. 22 — Replicarea ADN de la Adenovirus este inițiată separat la cele două capete ale moleculei și are loc prin îndepărtarea catenei matriță complementare (după Lewin, 2000).

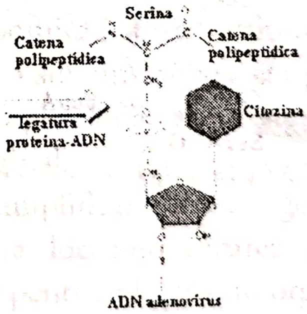

Serina
Catena polipeptidica
Catena polipeptidica
Citozina
legatura proteina-ADN
ADN adenovirus

Fig. 23 — Fosfatul terminal 5'' de la fiecare capăt al ADN de Adenovirus se leagă covalent la serina aflată în proteina de legare la ADN de Adenovirus; proteina ce are 55 kD (după Lewin, 2000).

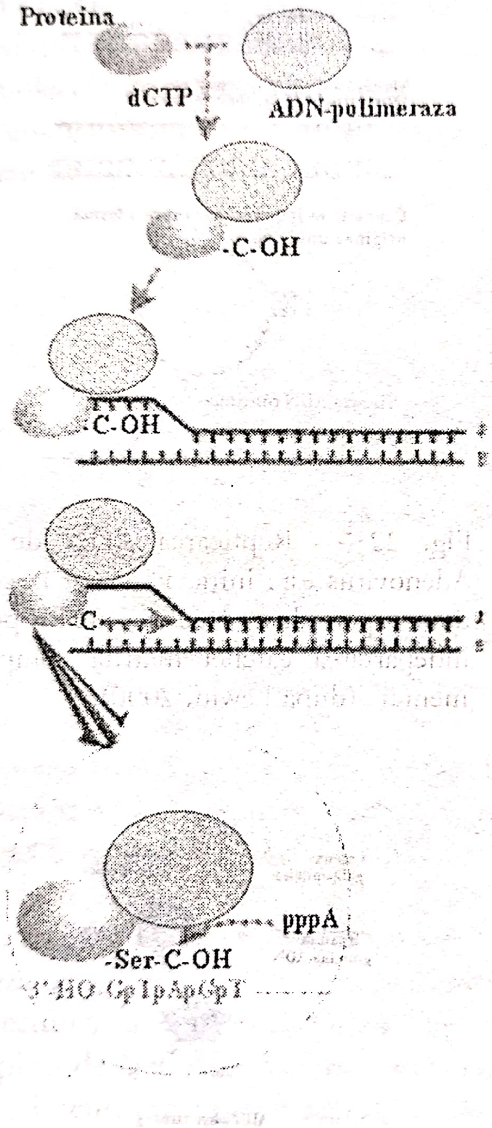

Proteina
dCTP
ADN-polimeraza
-C-OH
C-OH
C
pppA
-Ser-C-OH
3'-HO GpIpApGpT

Fig. 24 — Proteina terminală a Adenovirusului se leagă la capătul 5' al ADN și oferă un capăt C-OH spre a prima sinteză a unei noi catene ADN (după Lewin, 2000).

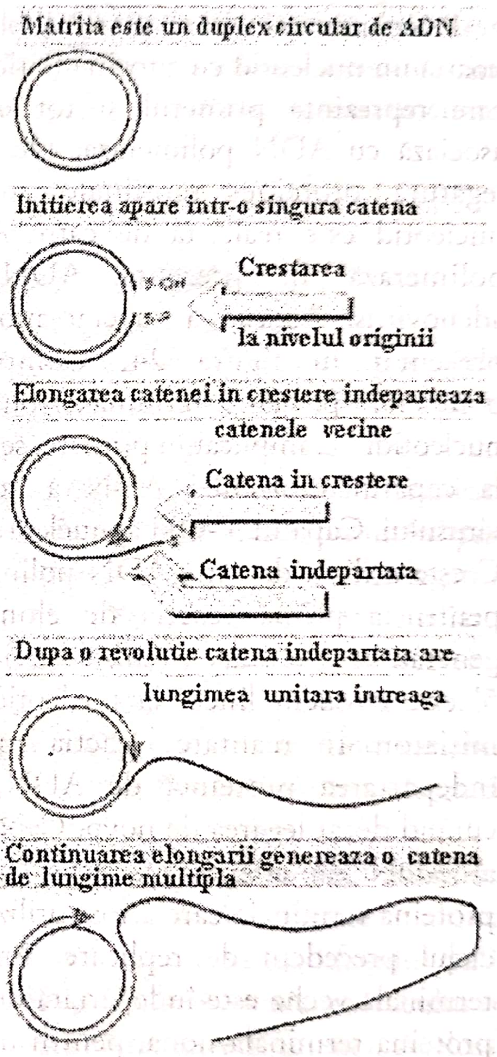

Matrita este un duplex circular de ADN
Initierea apare intr-o singura catena
Crestarea
la nivelul originii
Elongarea catenei in crestere indeparteaza catenele vecine
Catena in crestere
Catena indepartata
Dupa o revolutie catena indepartata are lungimea unitara intreaga
Continuarea elongarii genereaza o catena de lungime multipla

Fig. 25 — Inelul rotativ generează o coadă monocatenară multimerică (după Lewin, 2000).

pentru reacția de inițiere. Complexul de inițiere se poate forma între pozițiile 9 și 48, adică la o distanță fixă, față de capătul moleculei ADN.

9. REPLICAREA REPLICONILOR CIRCULARI (MODELUL INELULUI ROTATIV)

În cazul unor molecule circulare de ADN, are loc replicarea doar a unei catene, generându-se numeroase copii ale acesteia. Printr-o crestare monocatenară (desfacerea unei legături fosfodiesterice într-o catenă) are loc deschiderea acesteia, apărând astfel un capăt liber 3'OH ce este utilizat drept capăt primer de către ADN polimeraza. Catena nou sintetizată îndepărtează catena omoloagă, parentală, originală (fig. 25). Acest tip de structură se numește INEL ROTATIV, deoarece punctul de creștere poate fi imaginat ca învârtindu-se indefinit în jurul catenei matriță circulare, copiind-o într-o catenă complementară multimerică (cu numeroase unități complementare matriței). Pe când aceasta se deplasează, bifurcația de replicare alungește catena externă (complementară matriței) și o îndepărtează.

Deoarece materialul nou sintetizat este covalent legat la materialul original, catena îndepărtată are unitatea genomică originală la capătul său 5'. Unitatea genomică originală este urmată de un număr de unități genomice, sintetizate prin revoluțiile continue în jurul matriței (inelul rotativ). Fiecare revoluție îndepărtează materialul sintetizat în ciclul precedent (fig. 26).

Clivajul poate genera molecule ce conțin un singur genom (unitate genomică) și care reprezintă repliconul circular original, dar sub formă lineară, sau molecule ce conțin mai mult decât o singură unitate genomică, adică multimeri sau concatemeri. Forma lineară poate fi menținută ca o singură catenă sau poate fi convertită într-un duplex, prin sinteza unei catene complementare, care este identică în secvență cu catena matriță a inelului rotativ original.

Prin mecanismul inelului rotativ se poate realiza amplificarea unității genomice originale (repliconul). Prin acest mecanism, are loc amplificarea genelor ribozomale (ADNr) în ovocitele de *Xenopus*. Genele pentru ARNr sunt organizate aici ca un număr mare de repetiții contigui. O singură unitate de repetiție din genom este convertită într-un inel rotativ. Coada dislocată ce conține multe unități este convertită într-un duplex ADN care, ulterior, este clivat din acest cerc, astfel ca să poată avea loc unirea capetelor libere, generându-se un cerc mare de ADNr amplificat. Materialul amplificat constă dintr-un număr mare de unități repetitive identice.

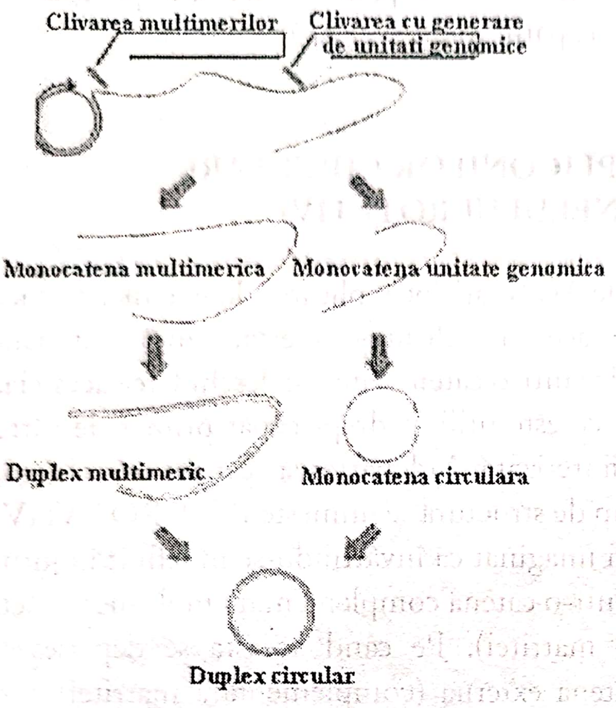

Clivarea multimerilor
Clivarea cu generare de unitati genomice
Monocatena multimerica
Monocatena unitate genomica
Duplex multimeric
Monocatena circulara
Duplex circular

Fig. 26 — Replicarea după modelul inelului rotativ generează catene cu multiple unități genomice multimere așezate una în prelungirea alteia (concatemeri). Catena multimerică poate fi clivată în puncte diferite, generând molecule de ADN de lungimi unitare genomice sau care conțin mai multe unități genomice (multimeri) (după Lewin, 2000).

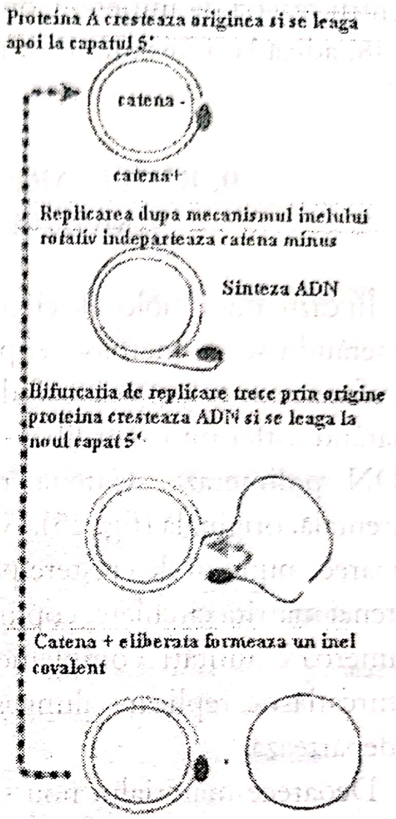

Proteina A cresteaza originea si se leaga apoi la capatul 5'
catena -
catena+
Replicarea dupa mecanismul inelului rotativ indeparteaza catena minus
Sinteza ADN
Bifurcatia de replicare trece prin origine proteina cresteaza ADN si se leaga la noul capat 5'
Catena + eliberata formeaza un inel covalent

Fig. 27A — Forma replicativă a ADN de φX174 este matriță pentru sinteza moleculelor genomice circulare monocatenare ale acestui fag. Proteina A rămâne atașată la același genom în cursul nenumăratelor revoluții, de fiecare dată crestând originea replicării din catena virală + și transferând-o la noul capăt 5'. Totodată, catena virală eliberată este circularizată (după Lewin, 2000).

Repliconi care adoptă mecanismul inelului rotativ de replicare sunt comuni printre bacteriofagi. Genomuri unitare pot fi clivate din coada dislocată, generându-se monomeri ce pot fi împachetați în particule fagice sau utilizate pentru următoarele cicluri de replicare.

În inițierea replicării ADN al fagului φX174 (fig. 27) intervine un complex de proteine numit PRIMOSOM ce poate fi vizualizat electronomicroscopic (fig. 28), după care este adoptat mecanismul inelului rotativ. Virionul conține

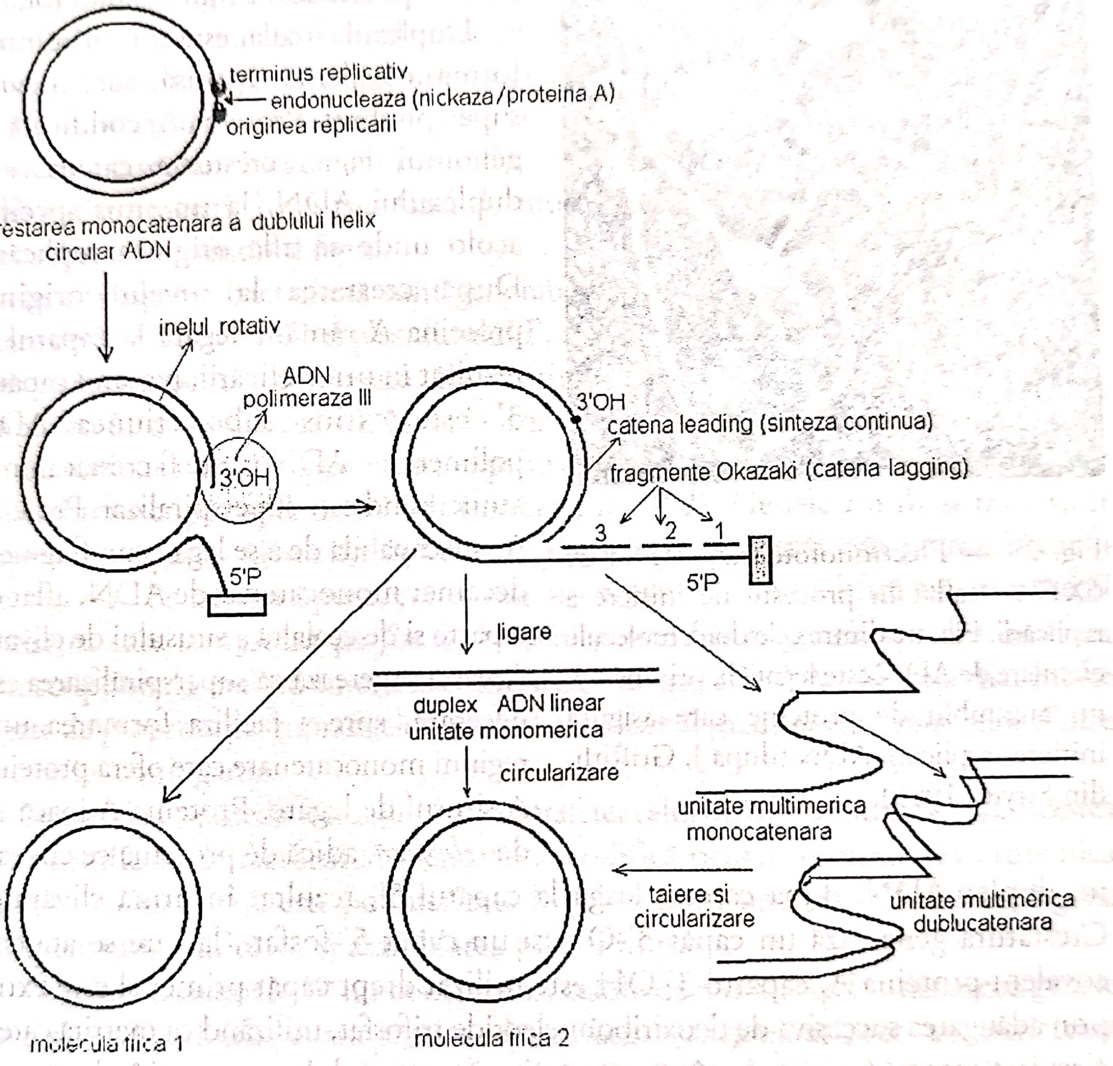

terminus replicativ
endonucleaza (nickaza/proteina A)
originea replicarii
crestarea monocatenara a dublului helix circular ADN
inelul rotativ
ADN polimeraza III
3'OH
5'P
3'OH
catena leading (sinteza continua)
fragmente Okazaki (catena lagging)
3
2
1
5'P
ligare
duplex ADN linear unitate monomerica
circularizare
unitate multimerica monocatenara
taiere si circularizare
unitate multimerica dublucatenara
molecula fiica 1
molecula fiica 2

Fig. 27B — Modelul inelului rotativ (original).

un ADN circular monocatenar, covalent închis, care este considerat catena +. Pe aceasta se sintetizează o catenă complementară, numită catenă -, ceea ce generează un duplex circular care este replicat prin mecanismul inelului rotativ.

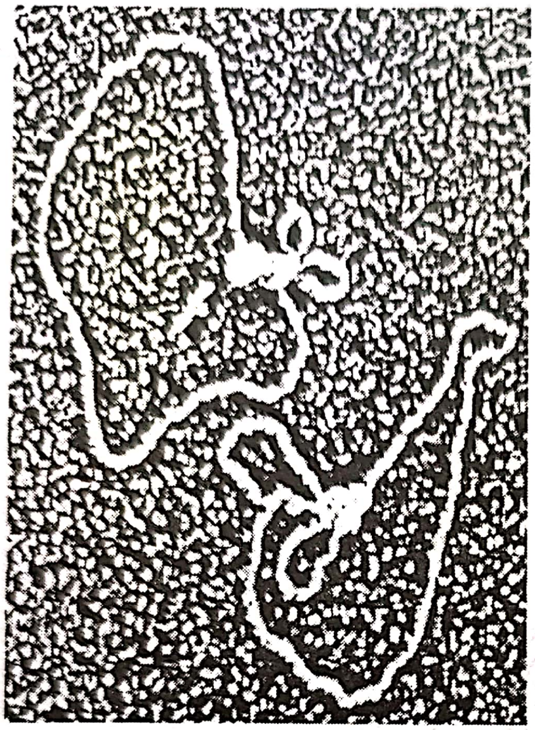


Fig. 28 — Electronofotografia ADN de ϕX174 – aflat în procesul de inițiere a replicării. Fiecare dintre cele două molecule circulare de ADN este legată la primosom, un ansamblu de proteine care asigură inițierea replicării ADN (după J. Griffith, din Stryer, 1995).

Duplexul circular este convertit într-o formă covalentă închisă care devine superspiralizat. Proteina A, codificată de genomul fagic, crestează catena + a duplexului ADN, la un situs specific, acolo unde se află originea replicării. După crestarea la nivelul originii, proteina A rămâne legată la capătul 5' rezultat în urma clivării, pe când capătul 3' este extins sub acțiunea ADN polimerazei. ADN poate fi crestat numai atunci când este superspiralizat. Proteina A este capabilă de a se lega la un fragment decamer monocatenar de ADN, aflat de o parte și de cealaltă a situsului de clivare. Aceasta sugerează că superspiralizarea este necesară, spre a facilita formarea unei regiuni monocatenare care oferă proteinei A situsul de legare. Proteina A joacă rol de *relaxază*, adică de proteină ce clivează un duplex ADN, după care se leagă la capătul 5', rezultat în urma clivajului. Crestătura generează un capăt 3'-OH și un capăt 5'-fosfat., la care se atașează covalent proteina A. capătul 3'-OH este utilizat drept capăt primer și este extins prin adăugarea succesivă de deoxiribonucleotide trifosfat, utilizând ca matriță catena circulară intactă (catena -), până ce se revine în punctul de pornire și îndepărtează originea. Acum, proteina A funcționează din nou. Ea rămâne în contact cu inelul rotativ ca și cu terminalul 5' al cozii îndepărtate. Proteina A recunoaște din nou originea și o crestează, atașându-se la capătul generat de noua crestare. Acest ciclu poate fi repetat indefinit. După evenimentul de crestare, monocatena + îndepărtată este eliberată sub forma unui cerc, proteina A fiind implicată în circularizarea acesteia. De fapt, sudarea capetelor 3' și 5' ale produsului catenei + este realizată de către proteina A, ca parte a reacției prin care aceasta este eliberată la capătul unui ciclu de replicare și începe un nou ciclu.

Proteina A este cis-activatoare in vivo, ceea ce înseamnă că proteina A sintetizată de un anumit genom se poate atașa doar la ADN al aceluiași genom. Nu se știe cum se poate realiza o asemenea înaltă specificitate.

In vitro, s-a constatat că proteina A rămâne asociată cu aceeași catenă matriță. Proteina A are două situsuri active, ceea ce îi permite să cliveze originea „nouă“, păstrând încă originea „veche“, pe de o parte, iar pe de altă parte, ea leagă capetele catenei îndepărtate, într-un inel covalent închis. Catena îndepărtată (+) poate avea două destinații, după circularizare: în cursul fazei de replicație a infecției virale, ea poate fi utilizată ca matriță, spre a fi sintetizată o catenă complementară (-). Structura circulară bicatenară poate fi apoi utilizată ca inel rotativ, spre a genera mai mulți progeni. În cursul fazei de morfogeneză, catena îndepărtată (+) este împachetată în virionul fagic.

În conjugarea bacteriană sunt generate genomuri monocatenare. O regiune mare de 33Kb din ADN al plasmidului F, numită REGIUNEA DE TRANSFER este necesară pentru conjugare. Ea conține 40 de gene numite locii *tra* și *trb*, implicați în transmiterea ADN de la donor la receptor.

Majoritatea acestor gene sunt exprimate coordonat, ca parte a unei singure unități transcripționale de 32 Kb (*unitatea tra Y-1*). Genele *tra M* și *tra J* sunt exprimate separat. Gena *tra J* este un reglator care activează atât pe *tra M* cât și pe *tra Y-1*. Pe catena opusă, *fin P* este un reglator care codifică un mic ARN antisens, care represează pe *fin O*. Numai patru dintre genele tra din unitatea transcripțională majoră sunt direct implicate în transferul ADN, cele mai multe legate de proprietățile suprafețelor celulei bacteriene și menținerea contactelor dintre bacteriile conjugante.

Bacteriile F^+ posedă formațiuni ale suprafeței celulare care se numesc *pili*. Acestea sunt codificate de factorul F. Gena *tra A* codifică pentru subunitatea proteinică numită *pilină* și care este polimerizată în pilus. Sunt necesare cel puțin 12 gene *tra*, pentru modificarea și asamblarea pilinei în pilus.

O celulă donatoare F^+ nu contactează celule de același tip F^+, deoarece genele *tra S* și *tra T* codifică pentru *proteine de „excludere și suprafață“*, ceea ce restricteaza contactul doar între o celulă F^+ și o celulă F^-. Pilii celulelor F^+ sunt situsuri de atașare a fagilor ARN și a fagilor cu ADN monocatenar, bacteriile F^+ fiind susceptibile la infecția cu acești fagi, pe când celulele F^- sunt rezistente la asemenea infecții.

Proteina Tra D este o proteină din membrana internă a bacteriilor F^+, necesară pentru transportul ADN. Ea este o componentă a canalului dintre bacteria F^+ și bacteria F^- pe care este transferat ADN al factorului F. Transferul factorului F este inițiat la situsul *ori T*, acronim derivat de la *„origin of transfer“* (originea transferului). *Ori T* este situat la unul dintre capetele regiunii transferate. Procesul de transfer poate fi inițiat, atunci când *Tra M* recunoaște că s-a format o pereche de celule conjugante. În acel moment, *Tra Y* se leagă lângă ori T și determină legarea lui *Tra I*. Această proteină este o relaxază, asemănătoare proteinei A de φX174. *Tra I* crestează ori T la un situs unic, desemnat *nic* și apoi formează o legătură covalentă la capătul 5' care a fost generat. De asemenea, Tra I catalizează desfacerea a cca 200pb de ADN, ceea ce înseamnă că are activitate de helicază. Capătul 5' conduce migrarea prin canalul de conjugare în celula receptoare. Monocatena migratoare este utilizată drept matriță pentru producerea unei catene complementară, devenind un factor F dublu catenar, iar celula receptoare devine din F^-, F^+. în același timp, monocatena ADN a factorului F, din celula donatoare servește ca matriță pentru sinteza unei catene complementare, ceea ce, pe ansamblu, este adoptat un mecanism de tip inel rotativ în sinteza conjugațională de ADN. ADN conjugativ apare astfel ca un inel rotativ. Numai o unitate a factorului F este transferată din celula donor, în celula receptoare, ceea ce presupune că trebuie să existe un mecanism care să asigure terminarea procesului, după o revoluție completă, după care este restaurată integritatea covalentă a plasmidului F.

10. CONTROLUL CELULAR AL REPLICĂRII

La nivel molecular, există un mecanism care asigură corecția replicării și care face ca un nucleotid liber, greșit împerecheat cu nucleotidul din matriță, să fie excizat, altfel încât desfașurarea polimerizării este stopată. La baza acestei activitati de corecție stă proprietatea pe care o are ADN polimeraza I de a realiza *proofreading*, adică „corecția citirii". Dacă o ADN polimerază I este modificată prin mutație, atunci se înregistreaza o creștere semnificativă a ratei mutațiilor, iar gena pentru ADN polimeraza I, care a suferit mutații, devine o așa-zisă *genă-mutator*.

Pe lângă acest mecanism de reglare a replicării mai există un control care se realizează la nivel celular. Dacă la procariote replicarea nu este restrânsă la o fază anume a ciclului celular, ea fiind potențial continuă pe parcursul întregului ciclu celular, în condiții optime de mediu, la eucariote, replicarea este plasată în interfază și restrânsă doar la stadiul S (de sinteză) al acesteia (fig. 29). Nucleul crește în dimensiuni, în special în timpul fazei S, când are loc și o creștere mai mult sau mai puțin vizibilă a cantității de proteine și ARN.

Celulele eucariote au un ciclu celular somatic ce reprezintă perioada dintre doua diviziuni mitotice succesive. Între sfârșitul unei mitoze și începutul următoarei diviziuni mitotice se întinde interfaza. Diviziunea propriu-zisă reprezintă faza M a ciclului celular (fig. 30). În timpul fazei G1 sunt sintetizate proteine și ARN, dar nu are loc replicarea ADN. Momentul in care este inițiată sinteza ADN marchează tranziția de la faza G1 la faza S. În timpul fazei S, tot conținutul de ADN este replicat, crescând treptat de la valoarea diploidă 2C la valoarea de replicare totală 4C. Perioada de la sfârșitul fazei S până la mitoză este denumită faza G2. Fazele G1 și G2 reprezintă *gap* (gol, adică absența sintezei ADN) din ciclul celular. Absența sintezei ADN în G1 și G2 este bine dovedită autohistoradiografic.

În vederea diviziunii, celula își dublează masa, după care își împarte în mod egal componentele sale celulelor fiice. Dublarea dimensiunii celulare este un proces continuu care implică reduplicarea materialului genetic și creșterea componentelor celulare prin mecanisme complexe de transcriere genică și translație a produșilor de transcriere care codifică pentru proteine.

Reduplicarea materialului genetic are loc într-un interval restrictiv al interfazei - faza S (de sinteza) a ADN, respectiv de reduplicare a cromozomilor. La nivel molecular, există evenimente cruciale care controlează tranziția între fazele ciclului celular. O parte dintre aceste evenimente necesită sinteza de noi proteine sau degradarea proteinelor deja existente; alte evenimente necesită activarea reversibilă sau ireversibilă a unor componente preexistente. În urma diviziunii mitotice rezultă două celule fiice identice, fiecare având o garnitura diploidă (2n) de cromozomi și o cantitate diploidă (2C) de ADN.

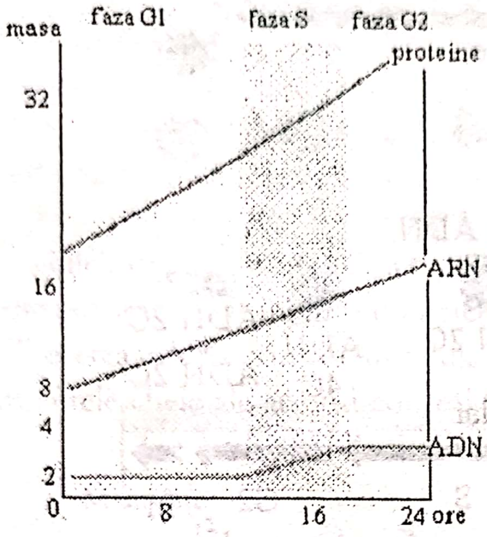


Fig. 29 — În cursul interfazei din ciclul celular, sinteza ADN are loc numai într-o anumită perioadă a interfazei numită faza S. Unitățile de masă sunt arbitrare (după Lewin, 1997).

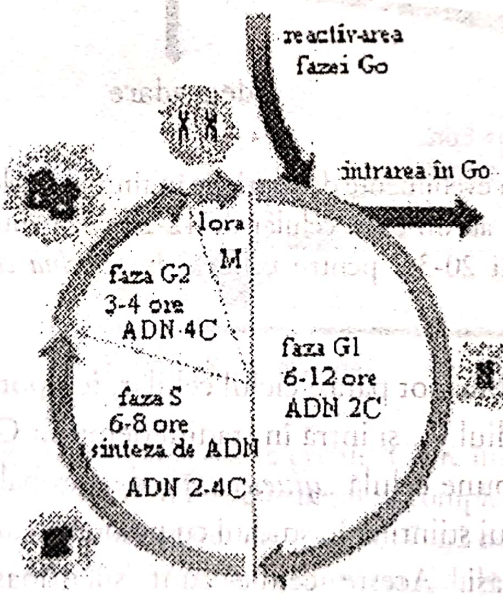


Fig. 30 — Interfaza este împărțită în trei stadii desemnate G1, S și G2. Celulele pot intra în G0 în care nu mai are loc replicația ADN și prin aceasta nici diviziunea celulară sau pot relua ciclul celular (după Lewin, 1997).

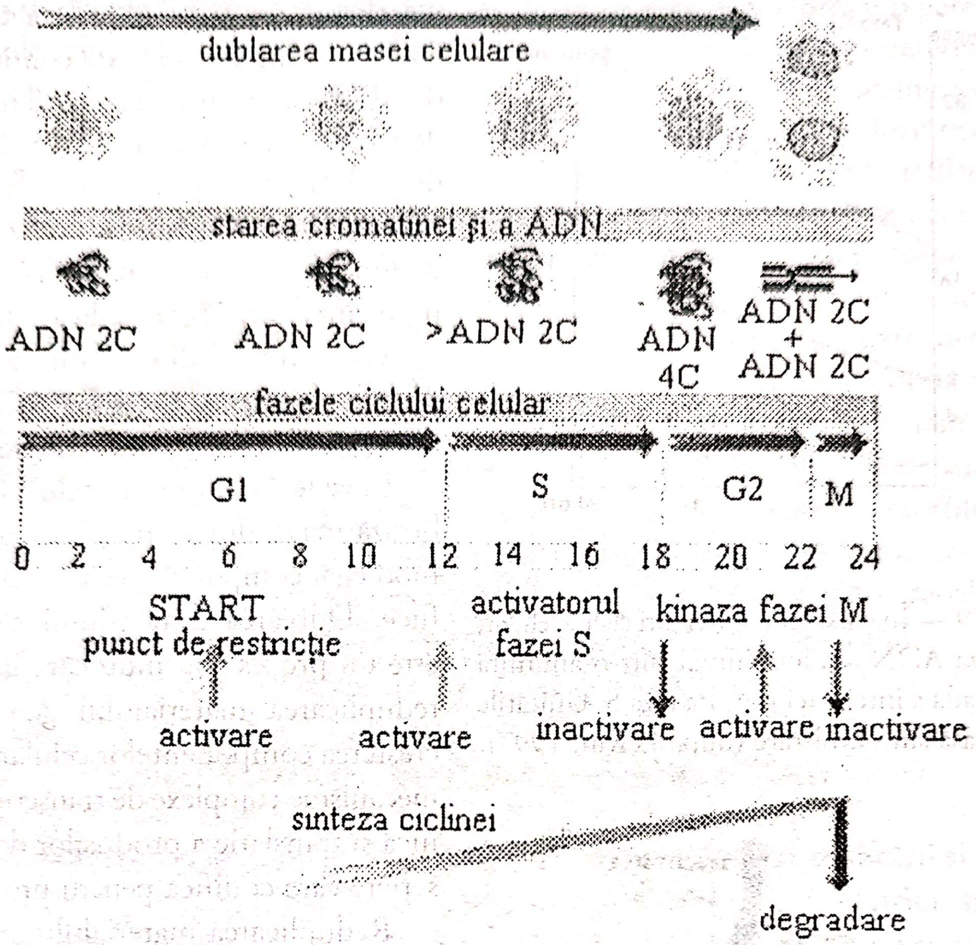

dublarea masei celulare
starea cromatinei și a ADN
ADN 2C
ADN 2C
>ADN 2C
ADN 4C
ADN 2C + ADN 2C
fazele ciclului celular
G1
S
G2
M
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24
START punct de restricție
activatorul fazei S
kinaza fazei M
activare
activare
inactivare
activare
inactivare
sinteza ciclinei
degradare

Fig. 31 — Controlul fazelor ciclului celular prin evenimente de restricție în timpul fazelor G1, S și M. Celulele care nu intră în faza G_0, au un ciclu celular de 12-24 ore pentru majoritatea celulelor mamiferelor și de numai 20-30' pentru celulele *Escherichia coli* (modificat din Lewin, 1997).

De multe ori, o celulă sau mai multe celule pot părăsi ciclul celular, temporar sau permanent. Acestea ies din ciclu în stadiul G_1 și intră în stadiul denumit G_0. Unei celule aflată în stadiul G_0 i se mai spune celulă *„qiuescentă“*, dar probabil această denumire este o reflectare a interesului științific în studiul cu predominanță al ciclului celular, decât al celulei însăși. Aceste celule sunt silențioase, îndeplinindu-și funcțiile sale în organism, de exemplu: secreție, conducerea impulsurilor nervoase, atacarea patogenilor etc.

Adesea, celulele G_0 sunt în faza terminală de diferențiere, fiind determinate să nu se mai dividă (sistem nervos): ele nu vor mai reintra niciodată în ciclul celular dar își vor îndeplini funcția lor specifică, destinată în organism, până vor muri.

Pentru alte celule, faza G_0 poate fi *reactivabilă*, celulele putând reintra în ciclul celular (în stadiul G_1). Aceste celule sunt determinate să nu se dividă în ritm rapid (mușchi, hepatocite, limfocite). Majoritatea limfocitelor se află în stadiul G_0, dar printr-o stimulare adecvată, ca de exemplu întâlnirea cu antigenul potrivit, ele pot reintra în ciclul mitotic și continua cu noi runde alternative de faze S și mitoză (fig. 31).

Celulele care nu intră în faza G_0 aparțin unui țesut proliferativ, în cadrul căruia se angajează imediat într-un nou ciclu celular, etc.

Trecerea celulei prin cliclul celular este controlată de proteine citoplasmatice. Elementele cheie ale acestui control îl constituie ***ciclinele*** *(G_1 ciclinele, ciclinele*

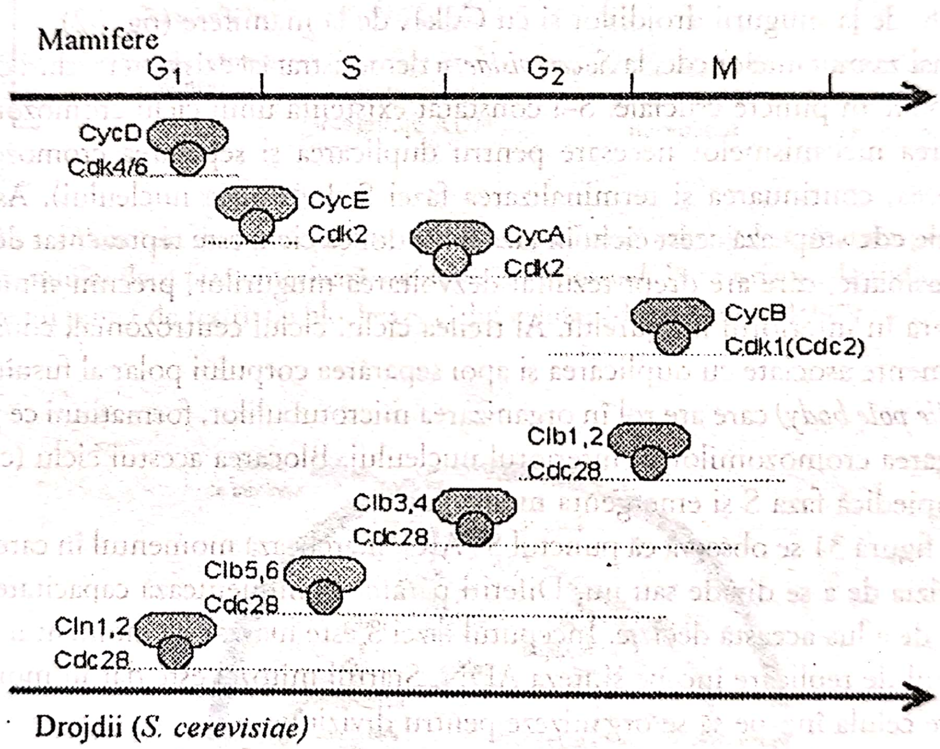


Fig. 32 — Complexele cyclin -CDK implicate în fiecare fază a ciclului celular. Liniile indică timpul în care este implicat complexul respectiv. În mugurii de drojdii, ciclul celular este inițiat de legarea lui Cln1 sau Cln2 de Cdc28. Apoi, Clb5 sau Clb 6 se leagă de Cd28, făcând astfel posibilă continuarea ciclului. Clb1 și Clb2 sunt implicate în faza finală. La mamifere, ciclul celular este inițiat de legarea Ciclinei D (CycD) la Cdk4 sau Cdk6. Pe măsură ce replicarea continuă, una dintre cicline care este împărțită de faza G1 și faza S (ciclina E) este distrusă, iar nivelul ciclinelor mitotice va fi în creștere (în G2). Faza finală este catalizată de legarea dintre CicliaB (CycB) și Cdk1. Complexul CycB-Cdk1 este cunoscut ca MPF, care inițial s-a denumit *factor de promovare a maturării*, dar acum mai este cunoscută și sub denumirea de *factor de promovare a mitozei* (după Lewin, 1997).

*fazei S, ciclinele fazei M)*și ***kinazele dependente de cicline*** *(CDKs: CDKs fazei* G_1*, CDKs fazei S, CDKs fazei M).* Nivelul ciclinelor scade și crește în concordanță cu stadiile ciclului celular (fig. 32).

Progresia prin ciclul celular este catalizată de kinazele dependente de cicline (**CDK**) care, după cum sugerează și numele, sunt activate de o clasă specială de proteine numite **cicline**. La mamifere, ciclinele sunt denumite *cicline A, B, C, D* ș.a.m.d. La mugurii drojdiilor (*S. cerevisiae*) au fost identificate nouă cicline: Cln 1–Cln3 și Clb1–Clb6.

La mamifere, proteinele superfamiliei CDK sunt notate cu **Cdk**, urmat de un număr, iar la drojdii cu **Cdc**, urmat, de asemenea, de un număr. Prima kinază identificată a fost Cdk2, la drojdia de fisiune (*S. pombe*) și este echivalentă cu Cdk28, de la mugurii drojdiilor și cu Cdk1, de la mamifere (fig. 32).

Analiza mutantelor cdc, la *S. cerevisiae*, a demonstrat că există trei cicluri celulare controlate în puncte cruciale. S-a constatat existența unui ciclu cromozomal cu activarea mecanismelor necesare pentru duplicarea și separarea cromozomilor (inițierea, continuarea și terminalizarea fazei S diviziunea nucleului). Astfel, o mutație **cdc** stopează acest ciclu în faza S. Al doilea ciclu este reprezentat de ciclul citoplasmatic, care are drept rezultat dezvoltarea mugurilor, precum și migrarea nucleară în interiorul mugurelui. Al treilea ciclu, ciclul centrozomal, constă din evenimente asociate cu duplicarea și apoi separarea corpului polar al fusului SPB *(spindle pole body)* care are rol în organizarea microtubulilor, formațiuni ce permit segregarea cromozomilor în interiorul nucleului. Blocarea acestui ciclu (cdc 31) nu împiedică faza S și emergența mugurilor.

În figura 31 se observă că punctul START marchează momentul în care celula ia decizia de a se divide sau nu. Diferiți parametri influențează capacitatea unei celule de a lua această decizie. Începutul fazei S este marcat de momentul în care aparatul de replicare începe sinteza ADN. Startul mitozei este dat în momentul în care celula începe să se organizeze pentru diviziune.

Trecerea celulei prin ciclul celular este realizată prin funcționarea unor puncte de control clar delimitate:

Decizia de a se angaja în replicarea cromozomilor este luata în G1. Dacă decizia de a-și replica ADN este luată, după o perioadă de *lag*, se intră în faza S, de sinteza replicativă. Punctul de control sau de angajare în replicare se numește *START* la drojdii și *PUNCT DE RESTRICȚIE*, la mamifere și om (fig. 33, 34).

Decizia de a se angaja în diviziune este luată la sfarșitul fazei G2. Dacă celula nu ia decizia să se dividă, ea devine autotetraploidă. În embriogeneza insectelor se înregistrează o asemenea situație, care este însă urmată de diviziuni nucleare succesive, fără celularizare, rezultând sinciții; după care are loc migrarea spre periferie

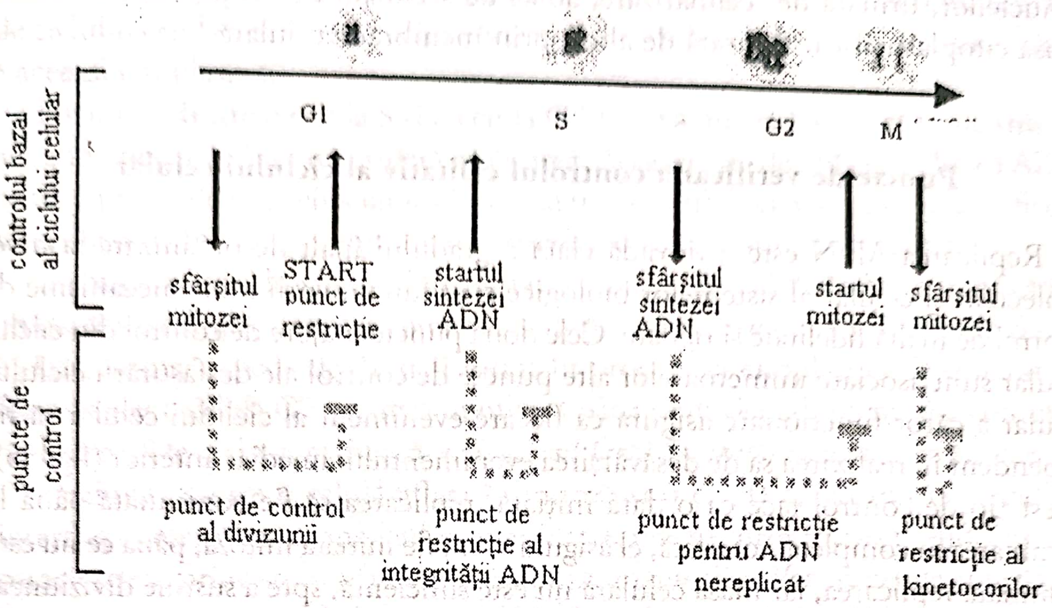

controlul bazal al ciclului celular
G1
S
G2
M
sfârşitul mitozei
START punct de restricţie
startul sintezei ADN
sfârşitul sintezei ADN
startul mitozei
sfârşitul mitozei
puncte de control
punct de control al diviziunii
punct de restricţie al integrităţii ADN
punct de restricţie pentru ADN nereplicat
punct de restricţie al kinetocorilor

Fig. 33 — Punctele de restricţie controlează capacitatea celulei de a înainta prin ciclul celular, numai dacă faza anterioară s-a desfăşurat normal. Bara orizontală indică stadiul în care un punct de restricţie blochează ciclul celular (după Lewin, 1997).

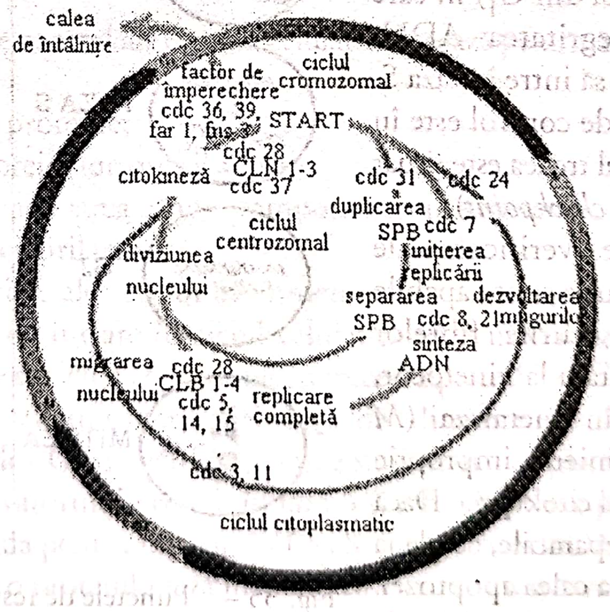

calea de întâlnire
factor de împerechere
cdc 36, 39, far 1, fus 3
ciclul cromozomal
START
cdc 28
CLN 1-3
cdc 37
citokineză
cdc 31
cdc 24
duplicarea SPB
cdc 7
ciclul centrozomal
diviziunea nucleului
iniţierea replicării
separarea SPB
dezvoltarea mugurilor
cdc 8, 21
sinteza ADN
migrarea nucleului
cdc 28
CLB 1-4
cdc 5, 14, 15
replicare completă
cdc 3, 11
ciclul citoplasmatic

Fig. 34 — Ciclul celular la *Saccharomyces cerevisiae* constă în trei cicluri care se separă după punctul START şi se alătură înainte de citokineză. (după Lewin, 1997).

a nucleilor, urmată de celularizare, adică de secluziunea fiecărui nucleu într-o masă citoplasmatică, separată de altele prin membrana celulară.

Puncte de verificare: controlul calitativ al ciclului celular

Replicarea ADN este o dovadă clară a gradului înalt de organizare la nivel molecular și celular al sistemelor biologice și al funcționării unor mecanisme de control de înaltă fidelitate și rigoare. Cele două puncte majore de control din cilclul celular sunt asociate numeroaselor alte puncte de control ale desfașurării ciclului celular a căror funcționare asigură ca fiecare eveniment al ciclului celular să fie dependent în realizarea sa de desăvârșirea evenimentului imediat anterior (fig. 35). Acest tip de control face ca o dată inițiată, replicarea să fie continuată până la terminarea sa completă; totodată, el asigură să nu fie inițiată mitoza, până ce nu este terminată replicarea, iar masa celulară nu este suficientă, spre a susține diviziunea.

Celula pare să monotorizeze prezența fragmentelor Okazaki pe catena lagging, nepermițând continuarea ciclului celular până ce acestea nu au dispărut. Un punct de verificare îl constituie G_1 *checkpoint* (punct de control din G_1) în care se verifică integritatea ADN, înainte ca celula să intre în faza S. Al doilea punct de control este în timpul fazei S și al treilea este situat după faza S (G_2 *checkpoint*).

Punctele de verificare ale fusului de diviziune sunt capabile să detecteze eșecurile fibrelor fusului de a se atașa la kinetocor, oprind celula în metafaza (*M checkpoint*) și alinierea improprie a fusului, blocând citokineza. Dacă alterările sunt ireparabile, celula ia decizia de a urma calea apoptozei.

Existența mecanismelor de reglare și a punctelor de control în desfășurarea ciclului celular a fost

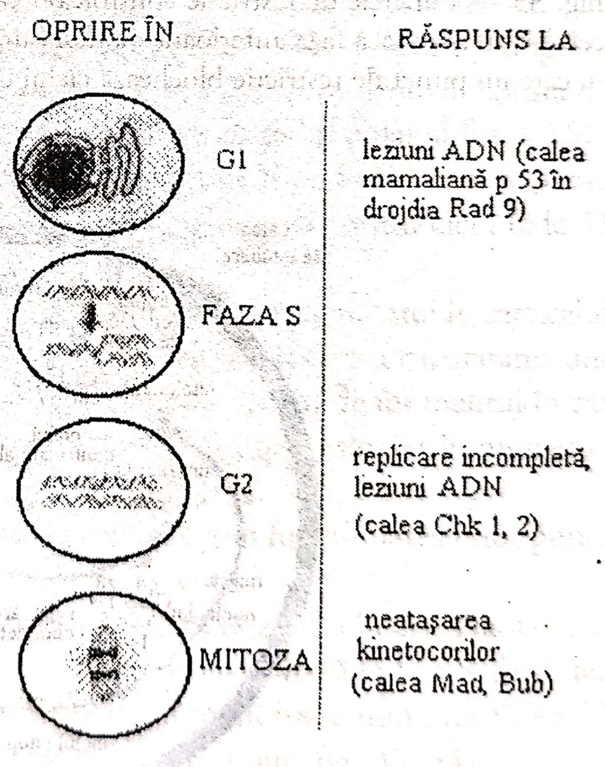

OPRIRE ÎN
RĂSPUNS LA
G1
leziuni ADN (calea mamaliană p 53 în drojdia Rad 9)
FAZA S
G2
replicare incompletă, leziuni ADN (calea Chk 1, 2)
MITOZA
neatașarea kinetocorilor (calea Mad, Bub)

Fig. 35 — Punctele de restricție pot stopa ciclul celular în multe etape, în urma răspunsului la condiții intrinseci sau extrinseci (după Lewin, 1997).

pusă în evidență prin experiențele de fuziune dintre celule aflate în diferite stadii ale ciclului celular, rezultând celule *heterocarion* - celule hibride cu doi nuclei într-o aceeași citoplasmă.

Fuziunea dintre o celulă S și o celulă G2 face ca nucleul S să continue sinteza, pe când nucleul G2 nu mai suferă replicarea. Aceasta este dovada faptului că ADN, odată replicat, devine refractar la efectele activatorului fazei S, ceea ce face ca fiecare secvență a ADN să se replice doar o singura dată, într-un ciclu celular.

Fiecare fuziune de celule aflate în stadii diferite ale ciclului celular implică însă un oarecare compromis în programarea în timp a mitozei: nucleul aflat în S intră în faza M mai repede decât ar fi intrat în propria sa citoplasmă de dinainte de fuziune, dar o celulă G2 nu intră în mitoză până ce nucleul din S nu și-a completat replicarea. De aici s-a dedus că *activatorul fazei S inhibă declanșarea mitozei.*

Fuziunea dintre o celulă aflată în mitoză și o celulă aflată în orice stadiu al interfazei determină ca nucleul celulei interfazice să intre într-o pseudo-mitoză, caracterizată printr-o *condensare prematură a cromozomilor* în celula interfazică. Aceasta înseamnă că în citoplasma celulei M se află un *inductor* al diviziunii celulare. Inductorii S și M au o existență tranzientă, concluzie dedusă din fuziunea dintre celule G1 și G2 care nu induc replicarea sau mitoza în nici unul dintre nucleii heterocarionului.

Pașii ciclului celular

Evenimentele de control ale ciclului celular se bazează pe următoarele mecanisme moleculare:

-sinteză de noi proteine;

-degradarea proteinelor preexistente;

-activarea și inactivarea unor componente preexistente, prin fosforilarea, respectiv, prin defosforilarea lor.

Aspectele esențiale ale acestor evenimente sunt :

– evenimentul de intrare în ciclul celular produs în G1, cu baza moleculară necunoscută (nu se știe cine condiționează trecerea peste *START/PR*; nu se cunosc amănunte despre natura perioadei *lag*, de dinainte de faza S); creșterea semnalelor ciclinelor G_1 pregătește cromozomii pentru replicare

– prezența activatorului fazei S, în faza S (**SPF – S phase promoting factor**) care pregătește celula pentru intrarea în faza S și duplicarea ADN (și a centriolilor); acest activator este o proteinkinază înrudită cu kinaza care activează mitoza, aceasta fiind prima kinază bine caracterizată a ciclului celular;

– activarea unei proteine preexistente numită kinaza fazei M (**MPF – M phase promoting factor**) stă la baza intrării celulei în faza M și inițiază asamblarea fusului mitotic, ruperea anvelopei nucleare, condensarea cromozomilor.

Kinaza fazei M are două subunități: - **subunitatea catalitică a kinazei** (activată prin modificare la debutul fazei M) și **ciclina**.

Denumirea de ciclină derivă de la faptul că ea se acumulează prin sinteza sa continuă în cursul interfazei și degradarea sa în cursul mitozei. Prin distrugerea ei se realizează inactivarea kinazei fazei M și ieșirea din mitoză a celulelor fiice. Aceleași mecanisme de reglare acționează în ciclul celular al tuturor celulelor eucariote.

Subunitatea catalitică a kinazei fazei M este *Cdk 2* și aceasta realizează fosforilarea serinei și a treoninei, în diferite proteine țintă. Ciclina este subunitate reglatoare care asigură funcționarea kinazei cu substrate corespunzătoare. Activarea Cdk2 la intrarea celulei în M se face prin modificarea conformației sale sub acțiunea ciclinei A, care se acumulează progresiv în celulă, până la granița G2-M când, atingând pragul cantitativ critic, se activează ca subunitate activatoare a kinazei fazei M. Cdk2 este ea însăși o fosfoproteină și starea sa de fosforilare este un determinant al activității sale. Pentru a deveni activă, kinaza fazei M trebuie să aibă grupări fosfat în anumite poziții și să fie lipsită de asemenea grupări în alte poziții.

Fosforilarea catalizată de kinaze și defosforilarea catalizată de fosfataze reprezintă evenimente cruciale în reglarea ciclului celular. Kinazele și fosfatazele răspund la semnalele externe și punctele de control prin fosforilarea, respectiv defosforilarea următorului component al sistemului de control. Ultimul rezultat al unui asemenea circuit este inducerea activității kinazei M sau a kinazei fazei S, prin controlul stării de fosforilare. Activarea kinazei fazei M este evenimentul care declanșează debutul fazei M. Inactivarea acestei kinaze este

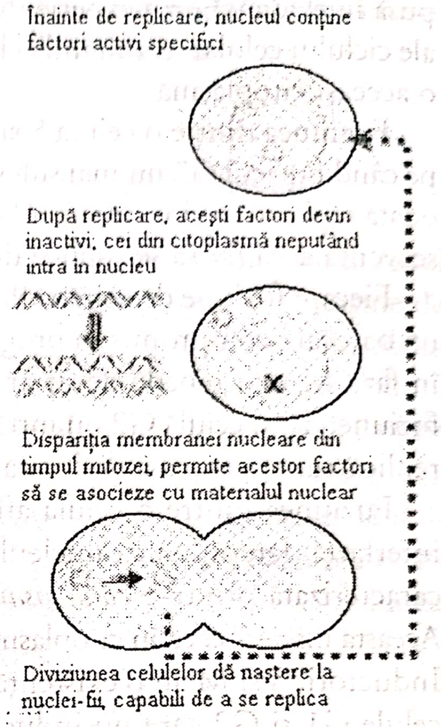

Înainte de replicare, nucleul conține factori activi specifici
După replicare, acești factori devin inactivi; cei din citoplasmă neputând intra în nucleu
Dispariția membranei nucleare din timpul mitozei, permite acestor factori să se asocieze cu materialul nuclear
Diviziunea celulelor dă naștere la nuclei-fii, capabili de a se replica

Fig. 36 — După replicare, factorii specifici sunt inactivați. Numai după ce membrana nucleară va fi degradată în timpul mitozei, acești factori vor deveni activi (după Lewin, 1997).

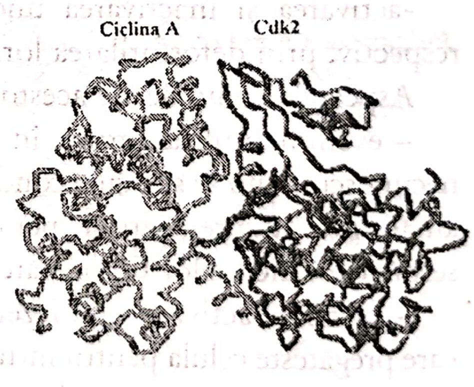

Ciclina A
Cdk2

Fig. 37 — Structura complexului Cyclină A – Cdk2 (după Lewin, 1997).

necesară pentru ieșirea celulelor fiice din mitoză. De aici, se deduce că evenimentele reglate de kinaza fazei M sunt reversibile. Fosforilarea unor substraturi este cerută de reorganizarea celulei într-un aparat mitotic, iar defosforilarea acelorași substraturi este cerută spre revenirea celulei la o organizare interfazică. Succesiunea de evenimente este astfel organizată încât degradarea ciclinei B în mitoză anulează blocajul celular al replicării și permite inițierea formării complexului de prereplicare, la nivelul originii. Începutul și sfârșitul fazei S sunt momente importante ale ciclului celular, celula trebuind să aibă mecanisme prin care să fie recunoscută realizarea completă a replicării. Aceasta se realizează prin examinarea stării ADN. Fiecare fază a ciclului celular are factori activi specifici (fig. 36). Între ciclină și kinaze se realizează complexe moleculare (eficient în controlul evenimentelor ciclului celular (fig. 37).

În celulele de șoarece, pentru activarea kinazei fazei M trebuie să aibă loc *defosforilarea* a doi aminoacizi din situsul de legare a ATP și anume *thr-14* și *thr-15*. Defosforilarea acestor doi aminoacizi se realizează prin intervenția unei fosfataze cu activitate duală. Fosfataza este activată de însăși kinaza fazei M. Kinaza fazei M este autocatalitică, adică activarea unei cantități mici de asemenea enzimă este suficientă să inducă activarea restului cantității de enzimă. O fosforilare are loc

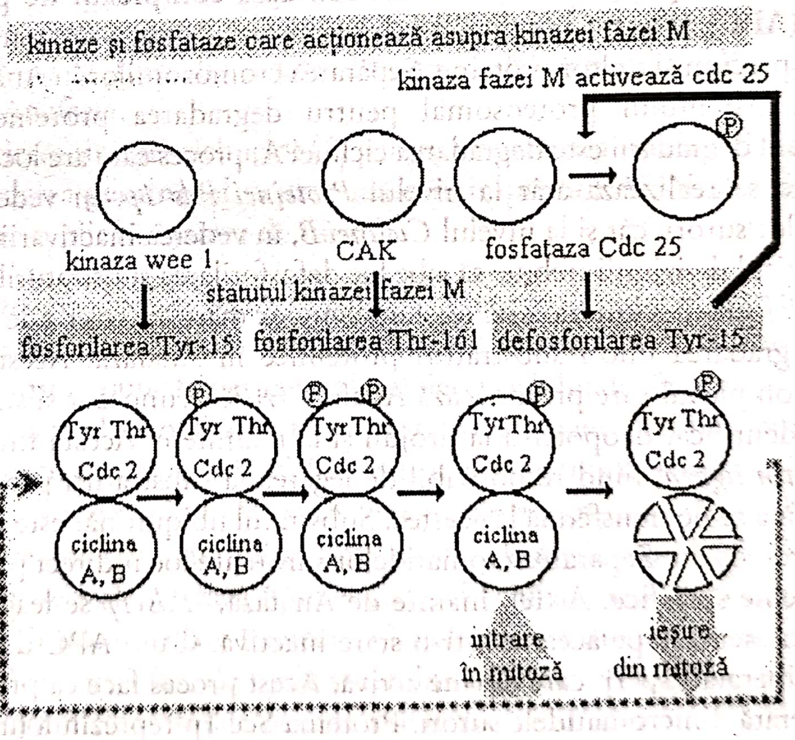

kinaze și fosfataze care acționează asupra kinazei fazei M
kinaza fazei M activează cdc 25
P
kinaza wee 1
CAK
fosfataza Cdc 25
statutul kinazei fazei M
fosforilarea Tyr-15
fosforilarea Thr-161
defosforilarea Tyr-15
P
P P
P
P
Tyr Thr
Cdc 2
ciclina A, B
intrare în mitoză
ieșire din mitoză

Fig. 38 — Controlul mitozei în celulele animale necesită fosforilarea și defosforilarea kinazei fazei M de către enzime, care ele însele sunt sub un control similar sau răspund la kinaza fazei M (după Lewin, 1997).

în restul thr-161, la Cdk2. Acest grup fosfat este adăugat în G2 și îndepărtat la sfârșitul mitozei, fiind cerut pentru activitatea Cdk2, fapt dovedit de mutațiile care introduc în această poziție un aminoacid care nu poate fi fosforilat. Asemenea mutații inactivează kinaza. *Ciclina A* are un motiv lângă terminalul N care reprezintă cutia distrugerii ciclinei, deoarece acesta reprezintă ținta proteolizei ciclinei (fig. 38). În partea de jos a figurii sunt schematizate modificările kinazei fazei M, iar în partea de sus sunt reprezentate enzimele care catalizează aceste modificări. O celulă iese din mitoză cu monomeri Cdk2 și fără nici o altă ciclină mitotică (deoarece ciclinele A și B au fost degradate în timpul mitozei). Ulterior, ciclinele sunt resintetizate. Fosfatul necesar la Thr-161 este adăugat de CAK *(cdc2-activating kinase)*. Kinaza **wee1** fosforilează Tyr 15, cu menținerea kinazei fazei M în stare inactivă. Fosfataza Cdc 25 îndepărtează fosfatul de la Tyr 15. Cdc 25 este ea însăși activată prin fosforilare; kinaza fazei M poate susține această fosforilare.

– Ciclinele sunt degradate de către un sistem proteolitic comun numit *proteosom*. Proteosomul este un complex de proteaze care își recunoaște ținta, numai atunci când lui i se adaugă *ubiqitina*. De aici, derivă existența ubicvitară a ubiqitinei și rolul său esențial în sistemele biologice.

– Factorul de promovare al fazei M activează **complexul de promovare a anafazei (APC)**. Pentru trecerea celulei prin faza M este necesară degradarea ciclinelor, precum și a altor proteine. Separarea cromozomilor în Anafază necesită activitatea sistemului proteosomal pentru degradarea proteinelor. Primul eveniment al degradării este degradarea ciclinei A, proces care are loc în Metafază. Degradarea se realizeaza atât la nivelul *Proteinei Pds 1p*, in vederea separării cromatidelor surori, cât și la nivelul *Ciclinei B*, în vederea inactivării kinazei fazei M. La sfârșitul diviziunii trebuie să aibe loc defosforilarea substraturilor proteinice pe care le-a fosforilat kinaza fazei M. Un complex mare, ce cuprinde 8 subunități, asigură degradarea unori substraturi proteinice în Anafază. Acest complex se numește complexul care promovează Anafaza (*APC*) cunoscut și sub numele de *ciclosom*, identificat deopotrivă la drojdii și la mamifere. Acesta funcționează ca *E3 ubiquitin ligază*, fiind responsabil de legarea la substraturi proteinice, astfel ca ubiquitina să fie transferată la acestea. Substratul ubiquitinat este apoi degradat de către proteosom. Separarea cromatidelor surori are loc indirect prin activitatea unor proteine specifice. Astfel, înainte de Anafază, *Pds 1p* se leagă la proteina *Esp 1p* și o menține pe aceasta într-o stare inactivă. Când APC degradează Pds 1p, este eliberată Esp 1p care devine activă. Acest proces face ca proteina Scc 1p să fie eliberată din cromatidele surori. Proteina Scc 1p reprezintă un component al complexului *COHESIN*, un fel de material lipicios care ține împreună cromatidele surori, în cromozomul metafazic. Miezul duplexului cohensin este un heterodimer al protinelor SMC. Alte proteine SMC formează *CONDENSINELE* implicate în controlul condensării cromozomale. Complexul cohesin conține proteine precum: *Scc 1p*, *Smc 1p și Smc 3p*, acestea două din urmă fiind posibile ATP-aze cu domenii spiralate. Când Scc1p este eliberată prin acțiunea proteinei Esp1p, complexul cohesin nu mai poate menține împreunate cromatidele surori, acestea fiind libere să migreze spre polii opuși ai fusului de diviziune. Ulterior, în Anafază, Scc1p este degradată de APC.

Formarea complexului cohesin sau asocierea sa cu cromozomii are loc în cursul fazei S. Mutanții în locusul *ctf 7* determină imposibilitatea asocierii cromatidelor surori. Gena *ctf 7* este activă în cursul replicării ADN. Replicarea asigură, pe o cale încă neelucidată, stabilirea coeziunii dintre cromatidele surori.

Smc 3p este deopotrivă implicată în mitoză și meioză. Aceasta este cerută de coeziunea cromatidelor surori, alături de o altă proteină, *Rec 8p*, înrudită cu *Scc 1p*, formându-se și în meioză un complex cohesin, ca în mitoză. Ambele componente sunt cerute pentru formarea complexului sinaptonemal.

Sistemul cohesin este ținta unui punct de control. Progresia prin mitoză reclamă ca toți kinetocorii să fie împerecheați cu omologii lor. Mutații ale genelor *mad* și *bub* permit continuarea aberantă a mitozei, fără a fi avut loc împerecherea kinetocorilor. *Proteinele Mad și Bub* normale asigură separarea anafazică și migrarea cromatidelor în Anafază. Ele se leagă la CDC 20, blocând-o să activeze APC. Când toți kinetocorii sunt atașați, un semnal încă neidentificat, determină eliberarea proteinelor Mad și Bub din CDC 20 care astfel activează APC, permițând desfășurarea Anafazei.

După inițierea sintezei ciclinelor G_1 pentru următoarea rundă a ciclului celular, are loc degradarea **gemininei**, o proteină care împiedică ADN nou sintetizat in faza S sa fie re-replicat, înainte de mitoză.

Descoperirea genelor supresoare de tumori a oferit posibilitatea descifrării mecanismelor de control al ciclului celular. Ele funcționează în mod normal, spre a inhiba sau pentru „a pune frâne“ creșterii celulei și ciclului de diviziune, prin această funcție împiedicând dezvoltarea tumorilor. Aceste gene codifică proteine care interacționează cu complexe cdk-cicline sau cu alte circuite din aval față de punctul de acțiune a acestor complexe. Mutațiile din genele supresoare de tumori determină celula să ignore una sau mai multe componente ale rețelei semnalelor inhibitorii. În felul acesta, se îndepărtează frânele ciclului celular, ceea ce va duce la o rată înaltă a creșterii necontrolate (cancer). Genele supresoare de tumori se definesc prin impactul absenței lor, de unde și tendința lor de a fi recesive: este necesară mutația ambelor alele normale pentru a se dezvolta un cancer.

Efectele complementare ale *protooncogenelor* și ale *genelor supresoare de tumori* converg în rețeaua moleculară a ciclului celular și determină:

– în celulele normale – parcurgerea progresivă, controlată, prin etapele ciclului
– în celulele canceroase – lipsa oricărui control (fig. 28).

Produsul genei supresoare de tumori *RB* este substrat pentru complexele *cdk-ciclina D* și își exercită efectul în cursul etapei din G1 care precede punctul de restricție. În celulele *quiescent* sau în prima parte a fazei G1, RB este legată la factorul de transcripție E2F, ceea ce determina două efecte:

1) sechestrarea și inactivarea factorului de transcriere E2F, astfel încât celula nu mai poate trece în faza S, deoarece nu pot fi transcrise genele ale căror produși proteinici sunt esențiali pentru desfășurarea fazei S;

2) complexul E2F-RB represează transcripția și a altor gene, astfel că în condiții normale, celula este blocată în G1.

Forma fosforilată a RB realizează un complex cu cdk2-ciclina, cel mai important fiind complexul *cdk 4, 6-ciclina D1,2,3.* Cel mai bine caracterizat substrat pentru *cdk-2 kinaza* este histona H1. În cursul fazei S aceasta este fosforilată cu două grupe fosfat, in timp ce, în cursul mitozei H1 este fosfoforilată cu încă patru grupe fosfat, sub acțiunea kinazei fazei M (fig. 39).

La apropierea de punctul de control sau de punctul de restricție, RB este fosforilată de cdk 4,6-ciclina D kinaza. Fosforilarea face ca *RB* să elibereze *E2F.* Acest factor de transcriere eliberat activează transcripția genelor ai căror produși sunt necesari în faza S. Totodată, este anulată represia genelor inactivate de către complexul *E2F-RB*. Expresia *E2F* în celulele *quiescent* face ca acestea să sintetizeze ADN și astfel să reintre în ciclul mitotic (fig. 40).

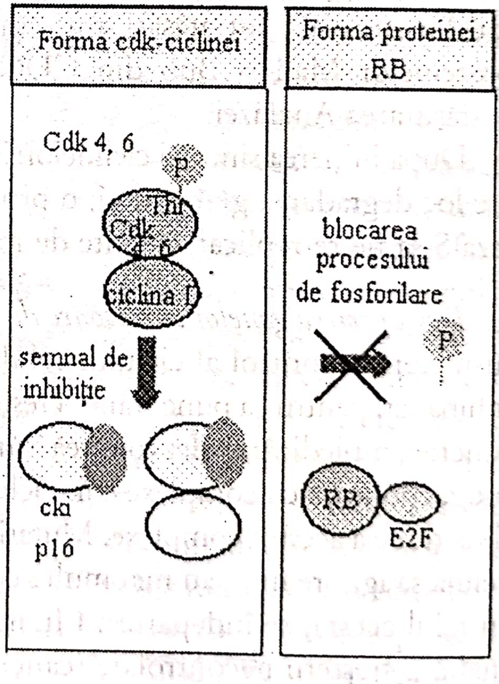


Fig. 39 — P16 leagă cdk4, cdk6 și dimerii cdk4, 6-ciclină. Prin inhibarea activității cdk-ciclinei D, p16 previne fosforilarea proteinei RB și păstrează inactiv E2F, astfel încât este incapabil de a iniția faza S (după Lewin, 1997).

Proteinele p107 și p130 sunt înrudite cu *RB* și se leagă cu alți membrii ai familiei *E2F* care recunosc gene cu aceleași elemente consens. RB este ținta mai multor căi metabolice care inhibă creșterea, iar pe această cale semnalele inhibitoare ale creșterii mențin celulele în G_0 și G_1 (fig. 40) Numeroase asemenea semnale, incluzând factorii inhibitori ai creșterii, precum *TGFβ,* acționează prin inhibitori ai cdk-ciclin kinazei. Asemenea inhibitori se numesc *cki.* Ei sunt proteine legate la dimeri cdk-ciclină în complexe inactive, așa cum sunt în celulele *quiescent.* Într-o formă inactivă, asemenea complexe nu pot realiza fosforilarea RB, din care cauză, aceasta nu permite intrarea celulei în faza S.

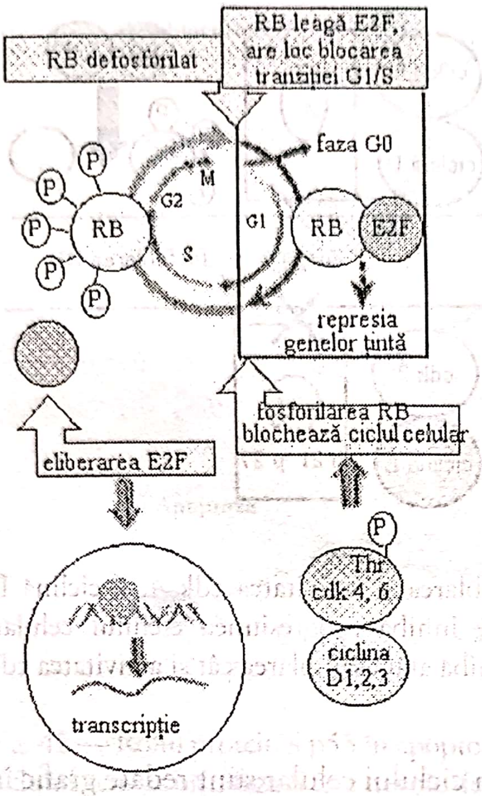


Fig. 40 — Când are loc fosforilarea proteinei RB de către cdk-ciclină, are loc deblocarea ciclului celular (după Lewin, 1997).

Proteinele cki sunt încadrate în două clase*: INK 4 și KIP*. ***Clasa INK 4*** include *p 16 INK 4A, p 15 INK 4B, p18INK 4C și p19 INK 4D*, acestea fiind specifice pentru *cdk 4 și cdk 6*.***Clasa KIP*** inhibă toate enzimele cdk specifice G1 și S și are trei membrii : *p21* $^{KIP\ 1/\ NAF\ 1}$, *p27* $^{KIP\ 1}$ *și p 57* $^{KIP\ 2}$, denumirile derivând de la greutatea moleculară și nume cazual, ca superscript. Proteinele INK 4 se leagă în mod specific la *cd4 și cd 6* și sunt implicate în tranziția G_0/G_1. Proteina *p16* nu poate inhiba proliferarea celulelor lipsite de RB, ceea ce înseamnă că ea funcționează prin impiedicarea activității cdk-ciclin kinazei de a utiliza RB ca substrat.

Proteina *p21* este un inhibitor universal al *cdk*, legându-se la toate complexele cu cdk 2,4 și 6. Ea blochează progresia celulei în ciclul celular, între G1 și S. În celulele animale, dimerii cdk–ciclină se află sub formă de complexe cuaternare, în care mai intră încă două componente: PCNA și inhibitorul p 21. PCNA este un component al ADN-polimerazei δ, ceea ce înseamnă implicarea sa directă în replicarea ADN. La valori stoichiometrice 1:1, p21 nu este totuși inhibitor. (fig. 41) Dar, dacă numărul subunităților p21 asociate dimerului cdk-ciclină crește, p 21 inhibă activitatea kinazică.

În celulele transformate, complexele cdk-ciclină sunt lipsite de p21 și PCNA, ceea ce sugerează implicarea proteinei p21 în controlul tranziției G_1-S, relaxarea acestui control fiind necesară pentru perpetuarea celulelor în cultură, absența sa conducând la instalarea stării de transformare. Proteina p27 are o secvență parțial înrudită cu aceea a proteinei p21 și se leagă promiscuitar la complexe cdk-ciclină. Supraexpresia proteinei p27 blochează progresia celulelelor cu TGF β și face ca acestea să intre în starea quiescentă, proces asociat cu creșterea concentrației de p27.

Proteinele *p21 și p 27* blochează subunitatea catalitică a dimerilor cdk-ciclină, aceasta nemaiputând fi substrat pentru activare prin fosforilare de către CAK. Aceste proteine blochează activitatea catalitică a complexelor cdk-ciclină. Complexele

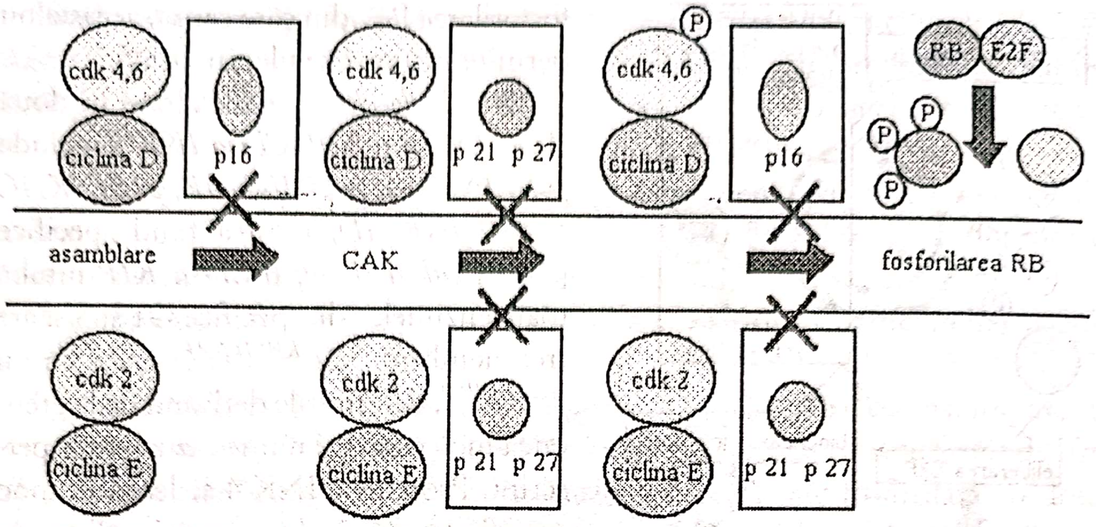


Fig. 41 — Proteinele p21 și p27 inhibă asamblarea și activitatea cdk 4, 6-ciclină D cdk-ciclină E de către CAK. Aceste proteine inhibă progresiunea ciclului celular, independent de activitatea RB. Proteina p16 inhibă atât asamblarea cât și activitatea cdk 4, 6-ciclinei D (după Lewin, 1997).

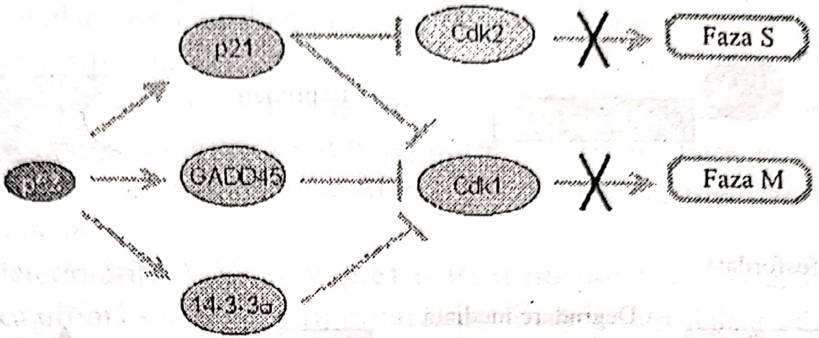
evenimente nucleare desfășurate în derularea ciclului celular sunt redate grafic în figura 43 Proteinele p21 și p27 sunt prezente în celulele din țesuturile proliferative, putând inhiba proliferarea celulelor lipsite de RB, ceea ce înseamnă că activitatea inhibitoare exercitată de către proteinele cdk-ciclină E este esențială. Cum ambele aceste proteine se află în celulele proliferative, progresarea normală a ciclului celular implică creșterea nivelului cantitativ al dimerilor cdk-ciclină, spre a depăși un anumit prag inhibitor al acestora.

Proteina *p27* este legătura majoră dintre mitogenii extracelulari și ciclul celular, existând o relație invers proporțională între activitatea acestei proteine și capacitatea proliferativă a celulei.

Calea de la proteinele *cki* la *RB* este, de asemenea, foarte importantă și este evidențiată de faptul că în orice stadiu al ciclului celular se întâlnesc supresori tumorali reprezentați de proteine cki, cicline D1,2 și RB. *Proteinele cki* supresează creșterea nelimitată a celulelor. Fiind în centrul componentelor de control al ciclului celular, asigurând trecerea peste puncul de restricție din G_1, atunci când sunt deja în cadrul unui țesut proliferativ și desfășoară un ciclu celular sau asigură reintrarea în G_1, atunci când celulele sunt în G_0, adică au statut de celule *quiescent*.

Deteriorările ADN ca și alte semnale de stres pot declanșa creșterea proteinei p53, care are trei funcții majore: **blocarea ciclului celular**, **repararea ADN** și **apoptoza:**

(a) blocarea ciclului celular


p53
p21
GADD45
14-3-3σ
Cdk2
Cdk1
Faza S
Faza M

(b) Apoptoză

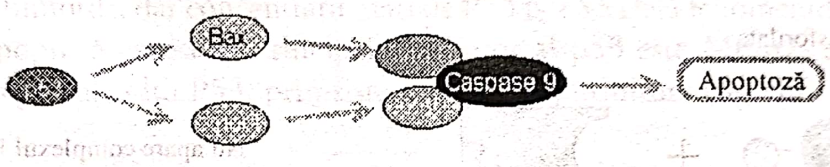

p53
Bax
Caspase 9
Apoptoză

Fig. 42 — Rolul proteinei p53 în apoptoză și blocarea ciclului celular (a). Pentru progresia ciclului celular prin faza S este nevoie de enzima Cdk2, care poate fi inhibată de proteina p21, iar pentru progresia prin faza este cerută Cdk1, care poate fi inhibată de proteina p21, GADD45 sau 14-3-3s. (b) Apoptoza poate fi indusă prin legarea caspazei 9 de citocromul c și Apafl. P53 poate activa expresia lui Apafl și Bax. Ultimul poate astfel stimula eliberarea citocromului c din mitocondrie.

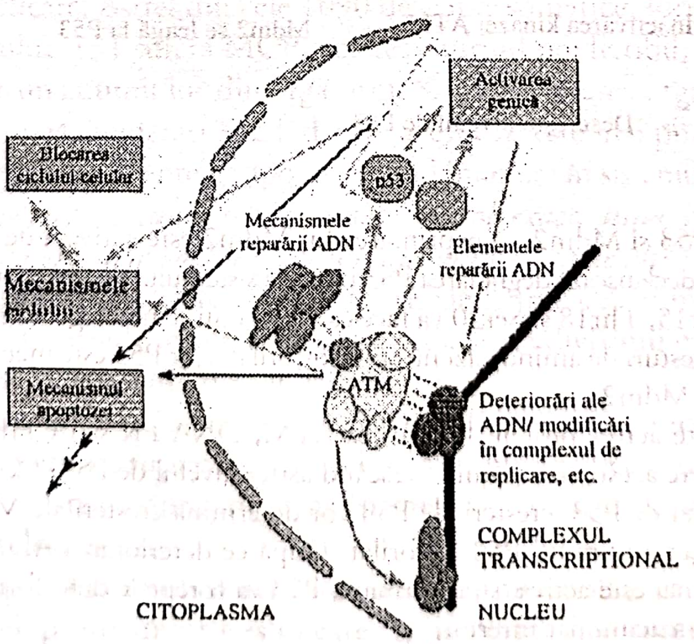

Activarea genică
Blocarea ciclului celular
p53
Mecanismele reparării ADN
Elementele reparării ADN
Mecanismele
Mecanismul apoptozei
ATM
Deteriorări ale ADN/ modificări în complexul de replicare, etc.
COMPLEXUL TRANSCRIPTIONAL
CITOPLASMA
NUCLEU

Fig. 43 — Evenimentele nucleare desfășurate în controlul ciclului celular.

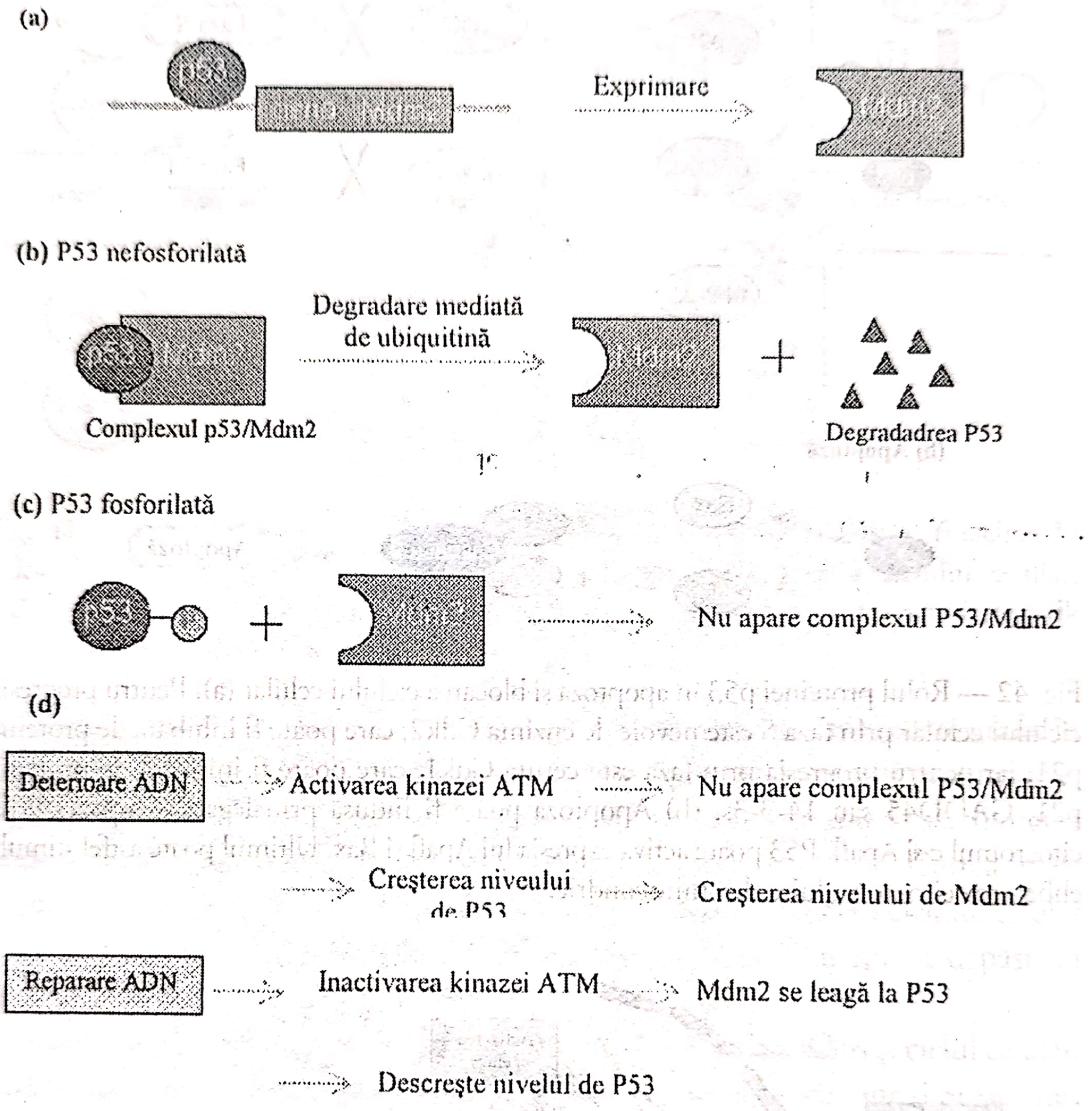

(a)
p53
Exprimare
Mdm2
(b) P53 nefosforilată
p53
Mdm2
Degradare mediată de ubiquitină
Mdm2
+
Complexul p53/Mdm2
Degradadrea P53
(c) P53 fosforilată
p53
+
Mdm2
Nu apare complexul P53/Mdm2
(d)
Deterioare ADN
Activarea kinazei ATM
Nu apare complexul P53/Mdm2
Creşterea niveului de P53
Creşterea nivelului de Mdm2
Reparare ADN
Inactivarea kinazei ATM
Mdm2 se leagă la P53
Descreşte nivelul de P53

Fig. 44 — Relația dintre P53 și Mdm2. a) exprimarea lui Mdm2 este activată de P53 b) legarea lui P53 la Mdm2 declanșează degradarea P53 pe calea sistemului de ubiquitinizare c) fosforilarea lui P53 la Ser15, Thr18 și Ser20 va face ca P53 să nu se mai lege la Mdm2. În celulele normale, aceste resturi de aminoacizi nu sunt fosforilate, iar P53 este menținută la niveluri scăzute de către Mdm2.
d) Deteriorarea ADN poate activa protein kinaze (ca ATM, DNA-PK sau CHK2) să fosforileze P53 la unul dintre aceste trei resturi, crescând astfel nivelul de P53. Deoarece nivelul Mdm2 este controlat de P53, creșteri ale P53 vor determina creșteri ale Mdm2, dar acestea nu vor avea efect asupra lui P53 fosforilat. După ce deteriorarea ADN este reparată, kinaza ATM nu mai este activă, și, ca urmare, P53 va fi repede defosforilată și degradată de Mdm2 care s-a acumulat interior.

– La deteriorări medii ale ADN, care pot fi reparate – P53 oprește progresia prin ciclul celular, prevenind replicarea anormală a ADN,

În același timp (fig. 42), P53 poate activa transcripția proteinelor implicate în repararea ADN. Una dintre genele țintă, p53R2, codifică ribonucleotid reductaza, care este importantă atât în replicare, cât și în reparare. P53 interacționează, de asemenea, cu endonucleaza AP și ADN polimeraza, implicate în *repararea prin excizia de baze*;

Când deteriorările ADN sunt prea mari și nu pot fi reparate, P53 induce apoptoza, ca ultimă soluție pentru evitarea proliferării anormale a celulelor (vezi fig. 42 și 43). Mai mult de jumătate din cancerele umane se datorează, de fapt, inducerii de mutații în p53.

Concentrația celulară de P53 trebuie să fie reglată cu mare strictețe. Ea supresează tumorile, dar concentrații mari de P53 pot accelera fenomenul de ***aging***, printr-o apoptoză excesivă. Principalul reglator al p53 este **Mdm2**, care poate declanșa degradarea lui P53, prin sistemul de ubiquitinizare (fig. 44).

11. APOPTOZA

În cursul dezvoltarii organismelor pluricelulare, unele celule sunt determinate să moară. În cursul embriogenezei, metamorfozei și înoirii țesuturilor sunt eliminate anumite celule, printr-un proces numit *moarte celulară programată* (MCP) sau *apoptoză*. Apoptoza asigură un control crucial asupra numărului total de celule.

La nematodul *Cenorhabditis elegans*, liniile celulare somatice au fost în totalitate identificate. Astfel,din cele 1090 de celule somatice, formate în cursul dezvoltarii adultului, 131 sufera MCP, acestea murind predictibil, într-un anumit moment și într-un anumit loc din organism. Și în dezvoltarea organismului vertebrat se înregistrează asemenea MCP dar, în acest caz, este mai puțin exact definit, cele mai evidente evenimente de apoptoza fiind întâlnite în sistemul imun și sistemul nervos.

Apoptoza trebuie supusă unui control exact, fiind crucială în organizarea și functionarea normală a organismului animal, ca de altfel și a celui vegetal (țesuturi de separație la căderea frunzelor, vasele lemnoase, în macrosporogeneză trei din cele patru celule rezultate în urma celor două diviziuni meiotice succesive, implică precise evenimente de MCP).

În organismul mamiferelor și al omului, eșuarea unor celule de a lua calea apoptozei, permite supraviețuirea celulelor tumorigenice și transformarea lor malignă.

Activarea improprie a apoptozei, pe de alta parte, este implicată în boli neurodegenerative.

Apoptoza implică activarea unei căi metabolice care conduce la sinuciderea celulei, printr-un proces în care celula devine mai compactă, membranele suferă modificare, prin aparitia unor umflături, cromatina se condensează și ADN se fragmentează. Această cale a apoptozei este un proces activ care depinde de o sinteză activă de ARN și proteine, în celula muribundă. Celula devine heteropicnotică, adică prezintă un nucleu mic, condensat și fragmentat. În cele din urmă,celula muribundă devine fragmentată în bucăți delimitate de membrană, putând fi înghițită de celulele înconjurătoare.

Apoptoza poate fi indusă de numeroși stimuli, printre care absența factorilor de creștere, tratament cu glicocorticoizi, iradiere X, activarea anumitor receptori. Toți acești factori afectează negativ celula, la nivel molecular. În cadrul sistemului imunitar, limfocitele T citotoxice atacă celulele țintă, inițiind apoptoza.

Capacitatea *proteinei p53*, produs al genei supresoare de tumori *p53*, de a declanșa apoptoza, reprezintă un mijloc important de apărare a organismului împotriva cancerului.

Un mecanism major declanșator al apoptozei la mamifere, este reprezentat de **sistemul receptorului Fas**. Un anticorp direcționat împotriva proteinei Fas omoară celulele care exprimă un asemenea receptor pe suprafața lor. Reacția anticorp-Fas activează Fas și acest mecanism de activare a Fas-ului declanșează procesul apoptozei.

Fas este un receptor de suprafață celulară, înrudit cu receptorul TNF (*factor de necroza tumorala*). Ligandul său este o proteină transmembranară înrudită cu TNF. Există o familie de receptori înrudiți cu TNF care, alături de doi receptori TNF și FAS, include mai mulți receptori întâlniți pe limfocitele T. O familie corespunzatoare de liganzi cuprinde o serie de proteine transmembranare. Aceasta sugerează existența mai multor căi, fiecare declanșată de o interacție celulă-celulă, în care „ligandul“ de pe suprafața uneia interacționează cu receptorul de pe suprafața alteia.

FAS și receptorii TNF pot în egală masură să activeze apoptoza. În afara formei legată la membrană, TNF există ca proteină clivată, solubilă, care, funcționează ca factor de creștere solubil. Sub această formă, produsă în cea mai mare parte de macrofage, TNF este un factor pleiotropic care semnalizează numeroase răspunsuri celulare, incluzând citotoxicitatea. Cele mai multe dintre aceste răspunsuri sunt declanșate de interacția cu unul dintre receptorii TNF, desemnat TNF-R1.

Răspunsul apoptotic al celulelor în cultură, în care se introduce receptorul TNF-R1 (asemenea celule neexprimând în mod natural asemenea receptor) este obținut atunci când se realizează tratamentul cu ligandul corespunzator. Aceste celule transfectate mor prin apoptoză, pe când celulele parentale supraviețuiesc. Rezultate similare se obțin când se utilizeaza ligandul *gld/receptorul Fas* sau *TNF/TNF-R1*. Simbolul *gld* derivă de la *„generalized lymphoproliferative disease“*, boală a șoarecilor provocată de o mutație în gena care codifică ligandul pentru receptorul Fas. Mutația care induce deficiență în *Fas* se numeste *lpr*. Aceasta este o mutație recesivă care determină proliferarea limfocitelor, o dereglare imună complexă care afectează deopotrivă limfocitele B și T. Calea apoptotică poate fi declanșată de interacția dintre ligand (produsul *gld*) și *Fas* (produsul *lpr*). Calea aceasta este necesară pentru limitarea numărului de limfocite mature.

Versiunile mutante ale receptorului demonstrează că răspunsul apoptotic este declanșat de un domeniu intracelular de aproximativ 80 aminoacizi, aflat în apropierea terminalului C. Această regiune este slab conservată (circa 28%) între Fas și TNF-R1 și se numește *domeniul morții*.

Au fost identificate mai multe proteine care interacționează în mod specific cu receptorii Fas și receptorii TNF, care declanșează apoptoza, atunci când sunt transfectate într-o celulă receptoare. Toate aceste proteine au domeniul morții și este posibil ca o interacțiune homomerică dintre două asemenea domenii să reprezinte mijlocul prin care semnalul este trecut de la receptor la următorul component al căii apoptotice.

O interacțiune ligand-receptor declanșează activarea unei proteaze, ceea ce conduce la eliberarea citocromului c din mitocondrii. Acesta, la rândul său, activează o serie de proteaze a căror acțiune cumulată, culminează cu distrugerea structurilor celulare. La nivelul receptorului se formeaza un complex ce conține mai multe componente. Receptorul TNF leagă o proteină numită *TRADD*, care la rândul său leagă o proteină numită *FADD*. Și receptorul Fas leagă FAAD. FAAD leagă proteina CASPAZA-8, numită încă FLICE care are un „domeniu al morții“ precum și o activitate catalitică proteazică și care inițiază o cale comună a apoptozei.

Familia Caspazelor se mai numeste familia Cistein-Aspartat Proteazelor și reprezintă componenți importanți din aval ai căii apoptotice. Prototipul este ICE sau CASPAZA-1 care reprezintă enzima de conversie a IL-1β spre a rezulta forma activă a acesteia. Transfecția lui ICE în celule aflate în cultură induce apoptoza acestora. Produsul virusului *cawpox*, desemnat *CrmA*, inhibă acest proces de apoptoză indusă ICE. Toate caspazele sunt inhibate de CrmA, fiecare caspază având sensibilitatea sa la acest produs viral. CrmA inhibă apoptoza indusă pe diferite căi, ceea ce înseamnă că enzimele caspaze joacă un rol esențial în procesul apoptozei. Caspazele au o cisteina catalitică și cliveaza țintele lor proteinice, la nivelul unui aspartat. La mamifere, s-au identificat opt membri ai familiei caspazelor. *Caspaza-3* este cea mai comună și implicată în mod curent în apoptoză. Ca și *ICE*, *caspaza 3* clivează o secvență tetrapeptidică din substratul lor, recunoscând-o specific, asemenea secvență fiind desemnată *YVAD* pentru caspaza 3 și *DEVD* pentru ICE.Evenimentul care activează o caspază este de regulă o oligomerizare. Declanșatorul care activează caspaza 8, prima caspază a căii apoptotice, este, după toate probabilitățile, oligomerizarea cauzată de asocierea cu receptorul. Mecanismul de activare este clivarea unei proenzime. De exemplu, *caspaza 3* este activată prin clivarea precursorului pro-caspazei, cu eliberarea a două fragmente care apoi se asociază spre a forma un heterodimer activ.

Schimbările din mitocondrii apar în cursul apoptozei ca și în alte forme de moarte celulara. Permeabilitatea mitocondriilor crește și astfel citocromul c este eliberat. Citocromul c joacă un rol de cofactor necesar pentru activarea *caspazei 9*. Pentru a muta procesul de la membrana plasmatică la mitocondrie, *caspaza 8* clivează o proteină numită *Bid*, eliberând domeniul C-terminal care este translocat la membrana mitocondrială, facând ca să aibe loc eliberarea citodromului c. Citodromul c induce interacția proteinei citosolice Apaf-1, cu caspaza 9. Când Apaf-1 oligomerizează cu procaspaza 9 are loc autoclivarea ce activeaza caspaza 9. Aceasta, la rândul său, clivează procaspaza 3 și rezultă caspaza 3 (fig. 45).

Eliberarea *citocromului 3* reprezinta un punct de control crucial în calea apoptotică. Bid este un membru al familiei Bd2. Unii membri ai acestei familii sunt implicați în apoptoză, pe când alții se opun acestui proces. Eponimul Bd2 inhibă apoptoza, în multe celule. Această proteină are o ancoră membranară C-terminală și se află pe membranele externe mitocondriale, nucleare și ale reticulului endoplasmic. Ea blochează eliberarea citocromului c, ceea ce contracarează acțiunea *Bid*. Inițial, bd2 a fost descoperită ca protooncogenă care devine activată în limfoame, prin translocația ce induce superexprimarea ei. *Bd2* este membru al unei clase de proteine care cauzează proliferarea sau tumorigeneza, atunci când sunt exprimate necorespunzător. Rolul său de inhibitor al apoptozei a fost descoperit atunci când s-a constatat că adăugarea sa la cultura de celule protejează celulele limfoide și mieloide față de

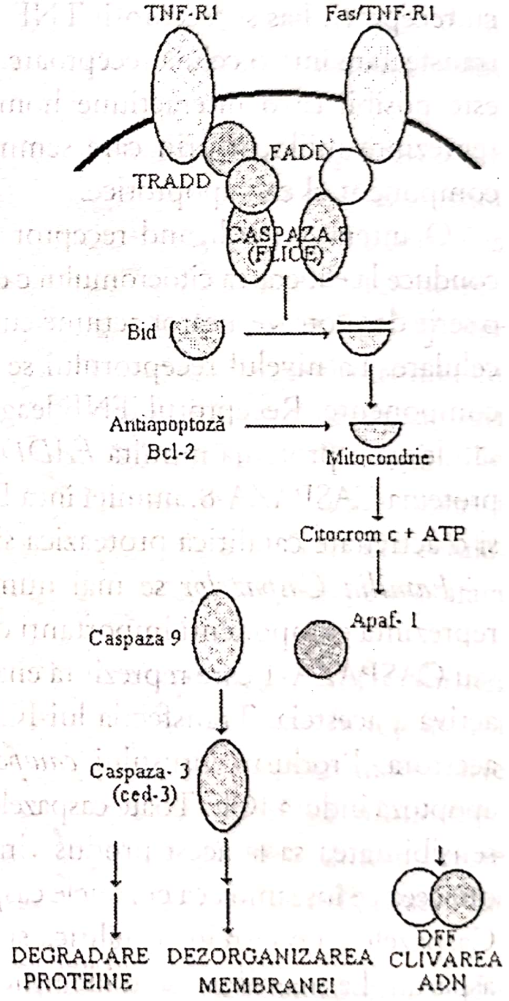


Fig. 45 — Apoptoza poate fi inițiată prin activarea receptorilor de suprafață. Caspazele sunt activate pe această cale. Apoptoza poate fi blocată de bcl-2 (după Lewin, 1997).

moartea celulară, atunci când factorul esențial *IL-3* este epuizat. *Caspaza 3* acționează într-un stadiu ce ar putea fi numit stadiul efector al căii apoptotice.

O țintă bine cunoscută a activității proteazice în apoptoză este enzima *PARP* (poli[ADP-riboza]polimeraza). Degradarea ei nu este esențială, dar este un diagnostic util pentru apoptoză. Caspaza 3 clivează o subunitate a dimerului *DFF (DNA fragmentation factor)*. Cealaltă subunitate activează apoi o nuclează care degradează ADN și astfel se realizează fragmentarea ADN, tipică apoptozei.

Apoptoza poate fi însă activată pe *calea Fas,* pe calea implicării kinazei *JNK,* al cărei substrat important este factorul de transcripție c-Jun și aceasta conduce la activarea proteazelor prin mecanisme încă neidentificate (fig. 46).

În *familia Bd2* se află și *Bax* care a fost evidențiat la om. Ca și ceilalți membri ai *familiei Bax* poate homodimeriza și heterodimeriza. Dimerii pot avea diferite efecte asupra apoptozei. Susceptibilitatea celulei de a suferi apoptoza poate fi proporțională cu raportul *Box/Bcl2.*

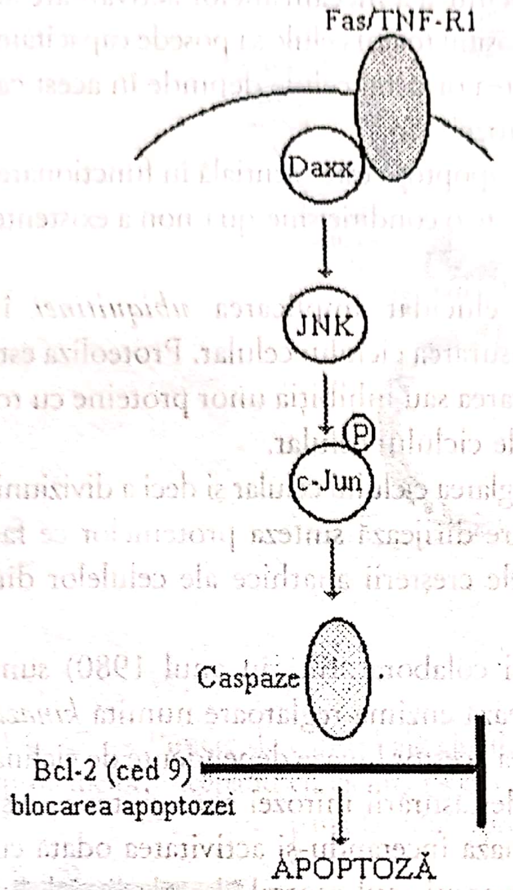


Fig. 46 — Proteina Fas poate iniția apoptoza printr-o cale mediată de proteina JNK (după Lewin, 1997).

Mitocondriile reprezintă punctul crucial de control în inducția apoptozei. Eliberarea citocromului c este precedată de schimbări în permeabilitatea membranei mitocondriale. Membrii *familiei Bd2* acționează la nivelul membranei mitocondriale, formând canale în aceasta. Bid este necesară în eliberarea citocromului c, iar Bax în modificarea permeabilității membranei.

O altă cale apoptotica este declanșată de limfocitele T citotoxice care omoară celulele țintă printr-un proces de eliberare de granule ce conțin serinproteaze și alte componente litice. Unul dintre aceste componente este perforina care poate realiza găuri în membrana celulelor țintă și în condiții propice omoară celulele țintă. Serin-proteazele din granule se numesc *granzime*. În prezența perforinei, granzima B induce apoptoza, inclusiv fragmentarea ADN. Ea activează *caspaza Ich-3* care este necesară în apoptoza realizată pe această cale. Șoarecii la care este blocată apoptoza prezintă anomalii, inclusiv defecte în dezvoltarea creierului.

Existența mecanismelor inhibitoare precum și a mecanismelor activatoare ale apoptozei sugereaza posibilitatea ca multe (posibil toate) celule să posede capacitatea intrinsecă pentru apoptoză.Viața sau moartea oricărei celule depinde în acest caz de modul în care ea își reglează căile apoptozei.

Relația replicare ADN-diviziune celulară-apoptoză este esențială în funcționarea celulelor eucariote. Desfășurarea ei normală este o condiție sine-qua-non a existenței vieții.

CONCLUZII: În ultimul timp s-a elucidat implicarea *ubiquitinei* în degradarea proteinelor participante în desfășurarea ciclului celular. Proteoliza este procesul biochimic major care asigură activarea sau inhibiția unor proteine cu rol cheie în parcurgerea etapelor biochimice ale ciclului celular.

Cum proteoliza este procesul crucial în reglarea ciclului celular și deci a diviziunii celulare, mutațiile care afectează genele care dirijează sinteza proteinelor ce fac obiectul proteolizei sunt determinatoare ale creșterii anarhice ale celulelor din procesul carcinogenezei.

Ciclinele (descoperite de Tim Hunt și colaboratorii, în anul 1980) sunt sintetizate masiv în cursul mitozei și activează enzima reglatoare numită *kinază* care adaugă fosfat la alte proteine. Activitatea acestor kinaze dependente de ciclină (CDK) declanșează mitoza. Pe parcursul desfășurării mitozei sunt sintetizate și degradate numeroase asemenea cicline, kinaza încetându-și activitatea odată cu terminarea mitozei. Proteoliza constituie mecanismul central al reglării ciclului celular. Inactivarea prin proteoliză a kinazei dependente de ciclină este cerută în mod normal pentru desfășurarea evenimentelor finale ale mitozei. Ciclina are o porțiune în care se află componenta importantă recunoscută de mașinăria proteolizei și prin a cărei înlăturare se asigură degradarea sa. O secvență de nouă aminoacizi reprezintă componenta recunoscută de această mașinărie, în realizarea distrugerii ciclinei, această componentă asigurând atașarea ubiquitinei la ciclină, marcând astfel ciclina care urmează să fie degradată. Intervenția ubiquitinei de această manieră constituie o etapă crucială în reglarea ciclului celular. Ubiquitina este o proteină cu 76 aminoacizi. Atașarea sa la proteinele ce urmează a fi degradate de complexul hidrolazic, proteolitic – proteosom – se numește *ubiquitinarea proteinelor*. În inițierea sintezei ADN în faza S este implicată o ciclină care atunci când este marcată cu ubiquitină este abrupt degradată și astfel poate fi începută sinteza replicativă a ADN. Atât sinteza și intervenția CDK cât și degradarea lor prin ubiquitinare sunt evenimente vitale în desfășurarea unui ciclu celular normal. Proteina inhibitoare pentru CDK desemnată *Sic 1* (p $40^{\text{Sic 1}}$) de la drojdie este degradată și astfel CDK este activată și începe replicarea ADN. Ubiquitina este direct implicată în degradarea Sic 1.

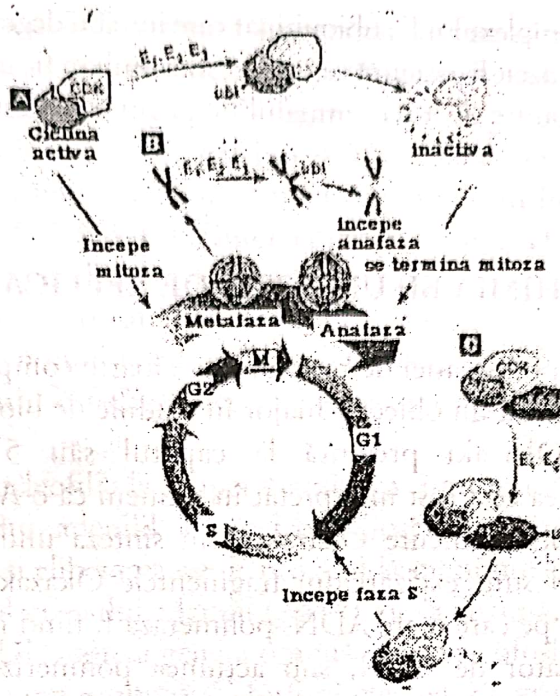

A
CDK
Ciclina activa
E_1, E_2, E_1
ubi
inactiva
B
E_1, E_2, E_1
ubi
Incepe anafaza
se termina mitoza
Incepe mitoza
Metafaza
Anafaza
M
G2
G1
S
Incepe faza S
C
CDK
inhibitor
E_1, E_2, E_3
ubi

Fig. 47 — Puncte de control ale ciclului celular. Ubiquintina (ubi) induce distrugerea proteinelor, începând cu ciclina (A), o posibilă proteină de ancorare la cromozom (B), până la inhibitorul kinazic (C). Întregul proces asigură derularea

Inhibitorul CDK de la mamifere, desemnat p 27, este degradat prin interacția sa cu ubiquitina. Și în separarea anafazică a cromozomilor este implicat procesul proteolitic în care intervine ubiquitina, fiind degradate alte proteine nonciclinice, spre a putea fi separate cromatidele surori.

Ubiquitina este atașată la proteina ce urmează a fi degradată printr-un mecanism tip „lanț de pompieri" *(bucket brigade)* care trece ubiquitina de la o enzimă numită E_1 la o a doua enzimă numită E_2, la o a treia enzimă E_3 și, în final, la proteina țintă, cum trec pompierii găleata cu apa luată de la un izvor, din mână în mână, pentru a stinge focul (fig. 37).

Proteinele Cdc 16, Cdc 23 și Cdc 27 formează un complex în celula de drojdie. Utilizându-se anticorpi împotriva proteinelor umane Cdc 16 și Cdc 27, s-a dovedit că acestea sunt localizate în fusul mitotic (fig. 48) fiind implicate în declanșarea mișcării anafazice. Complexul de proteine Cdc 16/23/27 este implicat în degradarea ciclinelor,

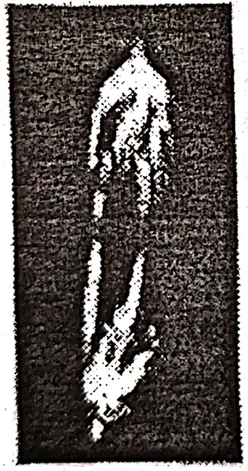


Fig. 48 — Localizarea proteinei Cdc16 în fusul mitotic prin utilizarea anticorpilor împotriva proteinelor umane CDC (după Lewin, 1999).

fiind componente ale complexului E_3 ubiquitinat care inițiază degradarea proteinică cerută de finalizarea mitozei. E_3 asigură ca toți cromozomii să fie aranjați pe fibrele fusului de diviziune, înainte de a da semnalul de pornire a acestora în mișcarea anafazică.

12. BIOCHIMIA BIFURCAȚIEI DE REPLICARE

Reacția de formare a bifurcației de replicare este foarte complexă și este încă în proces de elucidare, fiind un obiectiv major în studiile de biochimie.

Fiecare segment Okazaki prezintă la capătul său 5' un segment oligoribonucleotidic, ceea ce a fost interpretat în termeni că o ARN-polimerază asigură primarea acestor fragmente Okazaki prin sinteza unui ARN-primer. Ulterior, primerii ARN sunt excizați din fragmentele Okazaki, sub acțiunea activității exonucleazice pe care o are ADN–polimeraza I, fiind înlocuiți cu câte un segment corespunzător de ADN, sub acțiunea polimerizatoare a ADN polimerazei I, restrânsă doar la umplerea golului rămas în urma exciziei ARN primer.

Între două segmente Okazaki rămâne o crestătură monocatenară *(nick)*. Această crestătură va fi închisă de o enzimă numită *ADN-ligaza* care crează o punte fosfodiesterică între capătul 3'-OH al unui fragment Okazaki și capătul 5'-P al fragmentului Okazaki proximal.

Dacă într-un amestec de reacție in vitro se introduce ADN–polimerază I purificată, o moleculă bicatenară de ADN al fagului *φX 174*, crestată monocatenar, și cele patru deoxiribonucleotidetrifosfat, ADN polimeraza singură nu poate suda crestătura. În schimb ea se asociază prin situsul pentru capătul primer cu terminalul 3'-OH al catenei tăiate și îl atacă, excizându-l.

Astfel, înainte de a adăuga primul nucleotid la capătul 3'-OH, catalizând formarea primei legături fosfodiesterice, în procesul de refacere covalentă a monocatenei întrerupte, în urma nickării, activitatea exonucleazică 3'-5' a ADN-polimerazei I excizează un nucleotid de la terminalul 5'-P, de la nivelul primei legături fosfodiesterice a catenei rupte, astfel că tăietura se mută cu un nucleotid înainte. Această înaintare a crestăturii de-a lungul catenei întrerupte care va duce finalmente la eliminarea acestei catene se numește *ALUNECAREA, ÎNAINTAREA sau TRANSLAȚIA CRESTĂTURII (NICK TRANSLATION).*

O asemenea proprietate pe care o are ADN-polimeraza I de *E.coli* este foarte utilă, și este folosită ca atare, în marcarea radioactivă sau neradioactivă a moleculelor de ADN cu P^{32} sau marcaj chimic- fluorescent, spre a fi utilizate ca sonde moleculare în identificarea și clonarea de gene. Pentru aceasta, se utilizează marcarea corespunzătoare a dNTP care vor fi încorporate în catena neîntregită prin activitatea de translaţie a crestăturii pe care o are ADN polimeraza I. Dacă într-un asemenea amestec de reacţie se adaugă ADN-ligaza şi NAD, este închisă crestătura şi prin aceasta este eliminat 3'-OH, astfel că ADN-polimeraza I devine inactivă.

ADN-ligaza catalizează sinteza unei singure punţi fosfodiesterice între două grupe adiacente 5'-P şi 3'-OH, intervenind în repararea leziunilor induse în ADN şi în unirea segmentelor *OKAZAKI.*

ADN-ligaza este o catenă polipeptidică cu GM-75-77000 Da. ADN-ligaza specificată de genomul fagului T_4 are o GM-63-68000 Da.

Sinteza punţii fosfodiesterice catalizată de către ADN ligază se realizează în trei etape:

1- atacul nucleofilic la grupei ε-amino a unui rest de lizină din ADN ligază asupra fosfatului adenilil al nucleotidilfosfatului, cu formarea complexului ligază-adenilat şi eliberarea de nicotinamidă mononucleotid (NMN);

2- transferul grupului adenilil (AMP), de la enzimă, la capătul 5'-fosforilil al tăieturii din ADN, spre a genera o nouă punte pirofosforică;

3- atacul asupra grupului 5'-fosforil efectuat de grupul 3'-OH, cu formarea unei punţi fosfodiesterice şi eliberarea de AMP.

Depinzând de ATP, ligaza poate determina, de asemenea, relaxarea superhelixurilor ADN pozitive sau negative.

Sinteza ADN-ligazei specificate de fagul T_4 este dirijată de gena *30.* În condiţii restrictive, mutaţiile condiţional letale pentru gena *30* determină sinteza unei cantităţi mici de ADN, sub forma unor fragmente mici, cu coeficientul de sedimentare 10S care, în lipsa ADN-ligazei, nu se pot uni într-o catenă continuă. Din această cauză, rolul ADN-ligazei în replicare este vital.

Deficienţe în activitatea ligazică sunt remarcate şi la mutantul *light 7* al tulpinii K_{12} de *E coli,* termosensibil şi condiţional letal (neviabil la 42°, dar crescând normal la 30^0 C). Deşi creşte la 30^0C, el este încă deficient în capacitatea de a repara leziunile induse în ADN, prin iradierea ultravioletă sau agenţi alkilanţi. La 42^0C, în lipsa unei activităţi ligazice normale, are loc o acumulare de fragmente de ADN 10S care nu pot fi unite într-o catenă continuă, în procesul de replicare discontinuă. ADN-ligaza este deci o enzimă esenţială, atât în replicare cât şi în reparare.

Când bifurcaţia de replicare întâlneşte o ARN-polimerază angajată în transcripţie, bifurcaţia se deplasează de mai mult de zece ori mai rapid decât ARN-polimeraza, iar dacă se deplasează în aceeaşi direcţie, fie că bifurcaţia de replicare îndepărtează polimeraza, fie că îşi încetineşte viteza de deplasare, lăsând ca ARN-polimeraza să atingă terminatorul său. Dar, ADN-polimeraza care se deplasează în aceeaşi direcţie cu o ARN-polimerază poate realiza un „*bypass*“, fără a deranja procesul de transcripţie. Nu se ştie însă, prin ce mecanism se realizează un asemenea proces. Totuşi, când bifurcaţia de replicare întâlneşte o proteină legată la ADN, cum ar fi un represor, ea înlătură de pe ADN un asemenea represor, după care, acesta se reatașează la ADN.

Conflictul apare atunci când bifurcația de replicare întâlnește o ARN-polimerază care se deplasează în direcție opusă, adică spre ea. Dar, structura cromozomului bacterian este de așa natură, încât unitățile de transcriere sunt exprimate într-o aceeași direcție în care se realizează deplasarea bifurcațiilor de replicare. Numai în puține cazuri, există unități mici de transcripție care sunt exprimate rareori și care au sens opus direcției de replicare.

Sinteza acizilor nucleici in vivo se desfășoară în trei etape:

1. sinteza bazelor azotate – purinice-acidul inosinic
   – pirimidinice-acidul uridilic

2. sinteza nucleotidelor trifosfați:

ADN	**ARN**
dATP	ATP
dTTP	UTP
dCTP	CTP
dGTP	GTP

3. polimerizarea nucleotidelor, după mecanismul copierii matriță-replică, prin cataliză enzimatică.

Incapacitatea de a replica ADN este fatală pentru o celulă în creștere. Mutantele de replicare sunt condițional letale, fiind capabile de a realiza replicare în anumite condiții, numite condiții permisive, și incapabile de a realiza replicarea, în alte condiții, numite condiții nepermisive. Asemenea condiții pot fi de natură termică sau nutrițională.

Studiul unor asemenea mutante termosensibile ale bacteriei *E.coli* a permis identificarea unui set de loci genici, denumiți *genele dna*. Aceste mutante sunt clasificate în două grupe, pe baza comportamentului lor la creșterea temperaturii de la 37°C la 42°C. Clasa majoră a acestora este denumită MUTANTE STOP-RAPID și se caracterizează prin încetarea imediată a replicării, în momentul ridicării temperaturii, fiind deficiente în componentele aparatului de replicare, în special în enzimele implicate în elongare, dar și în aprovizionarea cu precursori.

Cea de a doua clasă de mutante este denumită clasa MUTANTE STOP-ÎNCET și se caracterizează prin aceea că pot realiza terminarea unei runde de replicare deja inițiată, dar nu mai pot iniția o nouă rundă de replicare, ceea ce înseamnă că sunt deficiente în elementele implicate în procesul de inițiere a unui ciclu de replicare, la nivelul originii.

Abordând analiza acestor mutante cu ajutorul testelor de complementație in vitro, s-au utilizat sisteme de replicare in vitro obținute de la *mutante tip dna*, operând în condiții în care ele sunt inactive. Se adaugă apoi diferite extracte de la tipul sălbatic și se urmărește dacă este estompată sau nu funcția normală de replicare. Identificând componenta activă din extractul provenit de la tipul sălbatic, se stabilește natura produsului genei *dna* care a suferit mutația. Actualmente este bine caracterizat produsul genic al fiecărei mutante *dna* de la *E.coli,* descifrându-se ce rol specific joacă acesta în replicarea cromozomului bacterian. La eucariote, sunt înalt purificate sistemele replicative, dar nu s-a ajuns încă la stabilirea exactă a rolului specific al acestora, în desfășurarea acestui proces.

A fost studiat rolul *proteinelor de șoc termic* de la *E.coli,* în replicarea ADN. Moleculele **Chaperone** au fost evidențiate într-o mare varietate de organisme. Aproape toate aceste molecule, fie că au fost găsite la procariote, la plante sau la mamifere, aparțin la trei clase de familii de proteine înalt conservate: familiile *Stress-70, Stress-60 și Stress-90.* Membrii acestor familii au fost găsiți în bacterii, mitocondrii, cloroplaste, citoplasmă și în lumenul reticulului endoplasmic al celulelor eucariote. In vivo, moleculele Chaperone au capacitatea de a recunoaște și a modula starea de pliere a polipeptidelor în celule. Multe proteine Chaperone sunt esențiale pentru viabilitatea celulei, potrivit condițiilor de creștere normală și sunt produse constitutiv sau abundent. În răspunsul la condiții adverse ale celulei, când proteinele sunt ușor denaturate sau depliate, la o mărire bruscă a temperaturii, rata de sinteză a unui grup de Chaperone-proteinele de stress sau de șoc termic *(hsps),* suferă o largă și o tranzientă mărire. În *E.coli,* cca 20 de proteine sunt sintetizate la o rată mare, când celulele sunt crescute la o temperatură ridicată. După inducere, proteinele *hsps* pot reprezenta cca 20% din totalul de proteine celulare.

Recent, capacitatea Chaperonelor de la *E.coli* de a asambla și a desasamba polipeptide oligomerice, complexe multienzimetice sau structuri macromoleculare a fost asociată cu procesul de replicare a ADN. Rolul proteinelor Chaperone induse termic: *DnaK, DnaJ și Grp E* este acum stabilit pentru replicarea unor genomuri plasmidice și bacteriofagice și se sugerează că acesta este esențial în stadiul de inițiere a replicării cromozomului de *E.coli.* Produșii genelor *dna K, dna J și grp E* participă în mod direct în răspunsul la stress, la *E.coli*: aceste gene sunt esențiale pentru creșterea normală a bacteriei. Genele *dna K* și *dna J* aparțin unui operon cu promotorul de comandă *dnaK-dna J.* Transcrierea acestor gene, ca și a altor gene implicate în răspunsul la șoc termic, este reglată pozitiv de către *rpo H.* Această genă codifică factorul σ^{32} (care are 32 KDa) și care recrutează direct ARN-polimeraza la promotorul genelor de șoc termic.

Rolul *hsps* în replicarea ADN la *E.coli*, este acela de a potența activitatea proteinelor esențiale pentru stadiul de inițiere al replicării ADN.

13. TERMINALIZAREA REPLICĂRII

Secvențele terminalizării replicării se numesc situsuri *TER* și reprezintă o secvență de cca 23 pb care cauzează terminarea in vitro. Secvența *TER* funcționează numai într-o singură orientare. Terminarea necesită produsul genei *tus* care codifică o proteină ce recunoaște o secvență consens și împiedică bifurcația de replicare de a funcționa mai departe. La *E. coli* bifurcațiilor de replicare se întâlnesc într-un punct situat la polul opus originii cromozomului bacterian. Au fost identificate două regiuni de terminalizare (ter E, D, A și ter C, B), regiuni localizate la aproximativ 100kb de o parte și de alta a punctului de întâlnire a bifurcațiilor de replicare. Ambele regiuni conțin terminatori multipli, fiecare specific pentru o anumită direcție. Astfel, fiecare bifurcație de replicare trece prin fiecare punct terminus, deplasarea acesteia fiind stopată atunci când ajunge la nivelului punctului terminus specific (fig. 49).

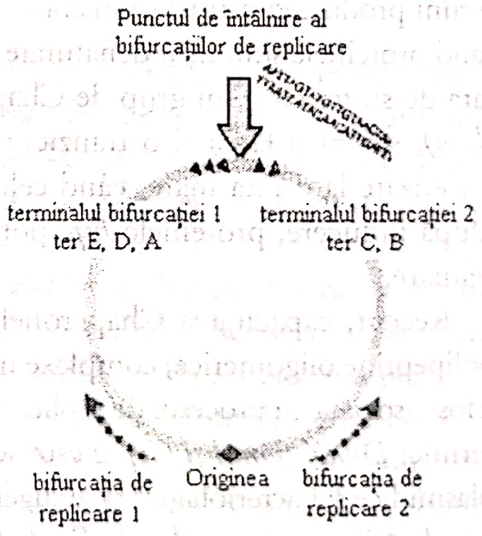

Punctul de întâlnire al bifurcațiilor de replicare
terminalul bifurcației 1
ter E, D, A
terminalul bifurcației 2
ter C, B
bifurcația de replicare 1
Originea
bifurcația de replicare 2

Fig. 49 — Terminalul replicării la E. coli este amplasat dincolo de punctul în care bifurcațiile de replicare se întâlnesc (după Lewin, 1997).

În cazul structurilor liniare ADN, mecanisme speciale asigură replicarea capetelor acestora:

conversia unui replicon linear într-unul circular sau într-o moleculă mutimerică, așa cum este cazul fagilor T_4 și λ. Pentru genomul eucariotelor, toți cromozomii neomologi din setul haploid se asociază telomeră-la-telomeră, formând o structură circulară, supracromozomală. După replicare, intervin endonucleaze care recunosc joncțiunile telomerice dintre cromozomi;

- crearea unei structuri *hairpin* la terminalul dublului helix, încât nu mai există capete libere; ADN mitocondrial de *Paramaecium* se replică prin formarea unui crosslink intramolecular;

- capătul nu este precis determinat, ci este variabil. Acesta, este cazul cromozomilor eucariotelor la care numărul de copii ale unei scurte unități repetitive de la capătul duplexului ADN se schimbă. Un mecanism de adăugare sau scoatere de unități repetitive face ca replicarea să nu fie necesară până la capătul moleculei;

- poate interveni o moleculă care face posibilă inițierea la terminalul adevărat. Astfel, numeroși acizi nucleici virali au molecule proteinice care sunt covalent lincate cu baza terminală 5’, așa cum este cazul ADN de Adenovirus, ADN al fagului φ*29* și ARN al virusului *polio*.

Pentru structurile circulare ADN nu se pune problema terminalizării.

Problema apare la structurile liniare, deoarece în catena replică *leading*, orientată 5’-3’, apare un gol **(golul de la capătul 5’)** care corespunde locului din care a fost excizat ARN-primer și care nu mai poate fi completat cu ADN, prin activitatea reparatorie a ADN polimerazei I, deoarece acesteia nu mai are cine să-i ofere aici un capăt 3’-OH liber. Astfel, replicarea telomerei cu orientarea de la 5’ la 3’ implică înlocuirea primerului catenei conducătoare.

Moleculele liniare de ADN la eucariote prezintă această problemă specială, în raport cu mecanismul de replicare de la capătul 5’ al catenei replică leading.

Îndepărtarea primerului cu care începe replicarea acestei catene lasă un gol neumplut opus capătului 3’al matriței. Dacă acest capăt ar fi lăsat neumplut, în decursul rundelor succesive de replicare, catena leading s-ar scurta cu o lungime echivalentă primerului. Această problemă ar exista la fiecare replicare și cromozomii ar deveni progresiv mai scurți.

Menținerea lungimii depinde de un grup de secvențe repetate care căpăcesc capetele cromozomilor. Aceste repetiții terminale constau din sute de copii de secvențe scurte bogate în GT, aflate la nivelul telomerelor. Capătul 5’al catenei bogate în G se continuă cu o prelungire monocatenară de cca 12-16 nucleotide. După îndepărtarea primerului, celula rezolvă problema umplerii golului cu ajutorul *telomerazei*. Rolul său este să adauge nucleotide la capătul 3’ al matriței ADN și să asigure umplerea golului rămas în urma exciziei ARN primer, de la capătul 5’ al catenei *leading*.

Telomeraza este enzima polimerizatoare de tip nucleoproteină care are ca grupare prostetică, o componentă ARN. Ea este o ADN-polimerază care folosește ca matriță internă componenta ARN . Existența componentei ARN a fost pusă în evidență prin utilizarea tratamentului cu RN-ază; s-a constat astfel că activitatea telomerazei este anihilată. Telomeraza este o reverstranscriptază care poartă în interior matriță ARN pentru sinteza ADN telomeric. La telomeraza de *Tetrahymena,* secvența de ribonucleotide a componentei ARN este 5’-CAACCCCAA-3’ și adaugă la capătul 3’ al prelungirii monocatenare de pe catena bogată în G: 3’-TTGGGG-5’.

Existența telomerazei explică cum poate fi completat capătul 5', fără a fi pierdute secvențe informaționale în procesul de replicare semiconservativă a ADN linear. Această enzimă este foarte activă în celulele germinale și mai puțin activă în mai multe celule somatice diferențiate; această observație demonstrează rolul telomerazei în durata vieții; odată cu îmbătrânirea, se remarcă o activitate mai scăzută a telomerazei și în consecință, o micșorare a capetelor cromozomilor în celulele somatice. În celulele tumorale, activitatea telomerazei este foarte crescută, ceea ce explică diviziunea necontrolată a celulelor. Telomerazele de la o specie pot să umple secvența telomerică de la alte specii: telomeraza de la *Saccharomyces cerevisiae* poate adăuga secvența telomerică la ADN de *Tetrahymena.*

14. SIMILITUDINEA MECANISMELOR DE BAZĂ ALE REPLICĂRII LA PROCARIOTE ȘI EUCARIOTE.

Multe dintre trăsăturile fundamentale ale procesului au fost înalt conservate în cursul evoluției. Etapele inițiale în replicarea ADN la procariote și eucariote sunt:

1. recunoașterea unei secvențe specifice de nucleotide reprezentând originea replicării;
2. destabilizarea, desfacerea *(unwinding)* locală a duplexului ADN. Această etapă determină specificitatea replicării ADN și totodată etapa care generează structuri asupra căreia este asamblată mașinăria enzimatică necesară pentru alungirea rapidă a catenei;
3. organizarea generală a bifurcației de replicare și procesele care apar pe catenele conducătoare *(leading)* și succesoare *(lagging)* sunt fundamental similare la procariote și eucariote;
4. atât la procariote cât și la eucariote, mașinăria de replicare la nivelul bifurcației este asimetrică, conținând o activitate ADN-polimerazică cu proprietăți biochimice potrivite pentru sinteza continuă de ADN și o alta cu proprietăți biochimice potrivite pentru sinteza discontinuă de ADN.

Există însă și diferențe importante în mecanismele de replicare la procariote și la eucariote. Genomul eucariotelor, mult mai complex , are multiple unități de replicare în cadrul unui singur cromozom, cu prezența telomerelor și centromerului, jucând roluri importante în segregarea cromozomală și în stabilitatea cromozomilor. Replicarea ADN la eucariote, spre deosebire de procariote, este restrânsă doar la faza S a ciclului celular. Mecanismele reglatoare care controlează replicarea ADN eucariot sunt mai complexe și mai diversificate decât cele care operează la procariote.

Replicarea ADN este reglată și prin contactul macromoleculei ADN cu membrane, membrana celulară prin intermediul mezozomului, derivat al acesteia la procariote și membrana nucleară la eucariote.

S-au descris și cazuri de *REPLICARE DIFERENȚIATĂ*, reprezentată de amplificare genică și subreplicare. În primul caz, are loc o extrareplicare a anumitor segmente ale genomului, în special ale genelor care determină sinteza diferitelor tipuri de ARNr. În al doilea caz, însoțind amplificarea anumitor gene, respectiv extrareplicarea acesora, subreplicarea face ca anumite segmente- de regulă zonele heterocromatice pericentromerice- să nu se replice în ritmul în care se replică alte zone. În cazul endociclurilor (cicluri de replicare, neurmate de diviziune), fie că sunt endomitotice (cu diferențiere de cromozomi mitotici, dar fără diviziunea nucleului, conducând la endopoliploidie), fie endoreplicative (politenia), apare endoreduplicarea întâlnită la aproape toate plantele superioare și multe specii de animale, în special diptere.

Un fenomen bine cunoscut de extrareplicare se înregistrează în cazul amplificării genelor ribozomale care are loc în ovogeneza amfibienilor. În timpul Profazei meiotice sunt replicate și transcrise extracopii de ADN ribozomal de la nivelul constricției secundare, unde este localizat organizatorul nucleolar ce conține genele pentru ARN ribozomal. Aceste extracopii se pot desprinde din regiunea organizator nucleolară în Pachiten, constituind axele a cca 1000 micronuclei extracromozomali. Aceste axe sunt de fapt molecule circulare de ADN asociate cu ribonucleoproteine. Ele se pot replica printr-un mecanism de tip ,, inel rotativ", ducând la o creștere enormă a cantității de ADNr, depășind cu mult cantitatea diploidă de ADN din nucleul celular, specifică speciei. Uneori, acești extranucleoli ies din citoplasmă, axele lor de ADN continuând să se replice și mai ales să fie transcrise în ARNr. Se asigură pe calea acestei amplificări genice ribozomale o rezervă mare de precursori ribozomiali, în primele stadii ale evoluției zigotului. Este aici vorba de o veritabilă „grijă maternă',' manifestată la nivel molecular.

Pe cale experimentală, în prezența unor concentrații progresiv crescute de methotrexat, analog al folatului, s-a constatat replicarea suplimentară și integrarea în cromozom a unor extracopii ale genei ce dirijează sinteza enzimei dihidrofolatreductaza. Pe această cale, celulele CHO-ovare de hamser chinezesc – și celulele unei linii melanomice de șoarece devin rezistente la methotrexat. Sintetizând o cantitate mare de enzimă care anihilează methotrexatul, celulele pot funcționa normal în prezența unor concentrații mari ale acestei substanțe, utilizate în terapia anticanceroasă.

Dacă, în acest caz, este vorba de o amplificare artificială, experimentală, a unei gene care dirijează sinteza unei proteine, în cazul genei pentru proteina chorionului, din ovarul de drosofilă, este vorba de o amplificare naturală, ce se desfășoară în timpul unei citodiferențierii normale. Este posibil ca amplificarea genică prin replicarea diferențiată să fie frecvent întâlnită în natură.

15. AMPLIFICAREA ADN-REACȚIA POLIMERIZĂRII ÎN LANȚ DE CĂTRE POLIMERĂ *(POLYMERASE CHAIN REACTION — PCR)*

Reacția polimerizării în lanț de către polimerază este o metodă al cărei principiu se bazează pe procesul replicării semiconservative și prin care se realizează amplificarea selectivă și rapidă a secvențelor țintă ADN sau ARN.

Concepută inițial, de către H.G. Khorana, dar pusă în aplicare în anul 1985, metoda PCR a produs în scurt timp o adevărată revoluție în Genetica moleculară. Acestei metode i se datorează în cea mai mare măsură progresele spectaculoase înregistrate în ultimul deceniu în elucidarea organizării structurale și funcționale a genomului diferitelor specii, incluzând specia umană, și deschiderea *Erei Genomice.*

Procedura este extrem de simplă, economică și în întregime automatizată. Eșantionul ADN, într-o cantitate care poate fi de ordinul a numai câtorva nanograme, este introdus într-un tub conținând următorii reactivi:

1. ADN-polimerază termostabilă-Taq 1 (extrasă din bacteria termofilă *Thermus aquaticus*);
2. cele patru deoxiribonucleotide trifosfat;
3. două oligonucleotide sintetice denumite *amorse* sau *primeri.* Amorsele, a căror secvență nucleotidică trebuie să fie complementară cu secvențele ADN care flanchează capetele segmentului ce urmează să fie amplificat, constituie punctele la nivelul cărora se inițiază activitatea Taq 1-polimerazei.

Proba ADN ce urmează a fi amplificată este denaturată termic, amorsele hibridizează cu secvențele complementare și pornind de la amorse, ADN-polimeraza începe să adauge deoxiribonucleotide în sensul 5'-3', pe matrițele reprezentate de monocatenele segmentului țintă. Răcirea în prezența excesului de amorse, conduce la hibridizarea acestora cu secvențele nou sintetizate, iar reîncălzirea soluției determină inițierea unei noi reacții de polimerizare. Procesul se desfășoară ciclic: la sfârșitul a n cicluri , în mediul de reacție vor exista 2^n molecule ADN dublu catenar, copii ale secțiunii ADN aflată între amorse (ale căror dimensiuni sunt cuprinse între 50 și 2000 pb). Ciclul de amplificare prin PCR presupune 3 etape (fig. 50):

1. denaturarea duplexului ADN, la temperaturi înalte (90-95°C, timp de 30-60 secunde);
2. alinierea primerilor oligonucleotidici la o singură catenă ADN. Această etapă se realizează la 37-65°C, depinzând de conținutul în GC al primerului și de

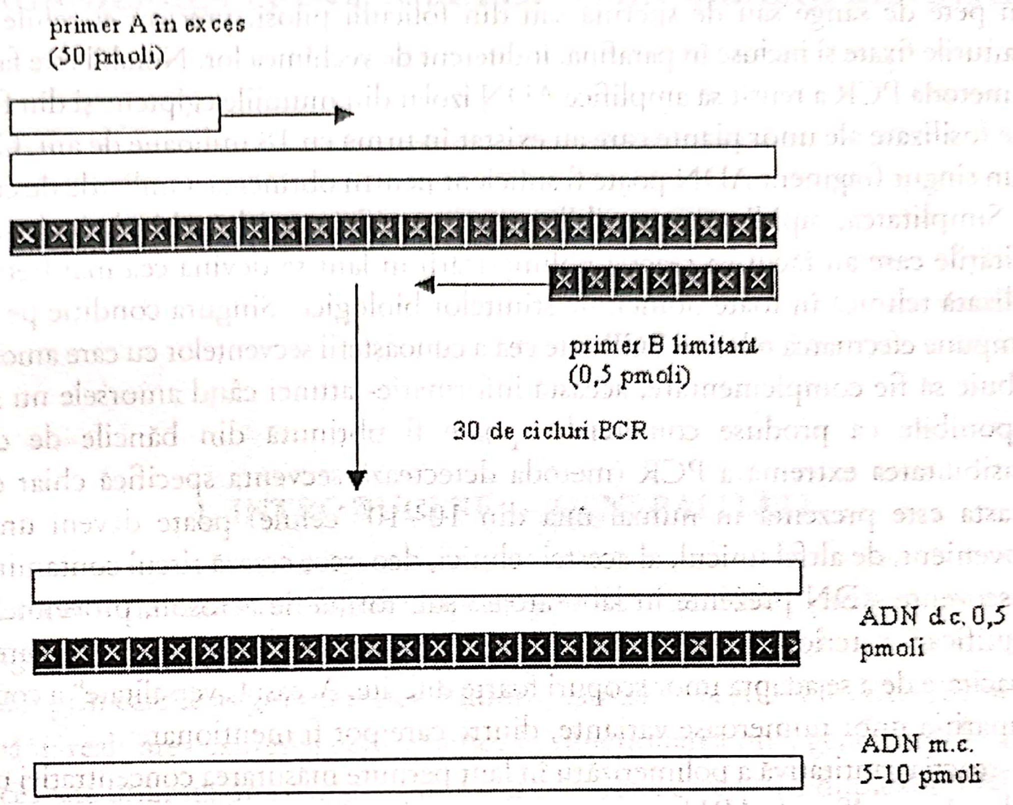


Fig. 50 — Reacția de polimerizare în lanț (PCR) a două catene ADN, utilizând primeri în exces pentru o catenă și primeri limitanți pentru cealaltă catenă ADN.

omologia existentă între primeri și matriță. Pentru o omologie de 100% între perechile matriță-primer și conținutul în GC de circa 50%, alinierea se realizează, de obicei, la 50-55°C, timp de 30-60 secunde;

3. extensia enzimatică cu Taq 1-polimerază a duplexului matriță-primer. Această reacție se desfășoară la o temperatură optimă pentru această enzimă care este în jur de 82°C. Timpul de extensie depinde de mărimea produsului final. Ca o regulă generală, se alege 1 minut pentru fragmentele mai mici de 0,5 kb, 2 minute pentru fragmente cuprinse între 0,5 și 1 kb, 3 minute pentru fragmente mai mari de 1 kb.

Importantă pentru înțelegerea caracterului selectiv al amplificării este precizarea că în moleculele duplexurilor ADN, cele două catene complementare sunt orientate antiparalel (5'-3' și, respectiv, 3'-5'). Polimeraza Taq se atașează la capetele 3' ale amorselor și operează adăugând nucleotide numai în sensul 5'-3'. După cicluri repetate de amplificare, secvențele copiate vor deveni prevalente în mediul de reacție, depășind cu mult numărul celorlalte secvențe din eșantionul inițial.

Metoda este compatibilă cu ADN provenit din cele mai variate surse. Pot constitui surse de ADN celule obținute prin lavaj sau aspirație, cele din frotiuri, din pete de sânge sau de spermă sau din foliculii piloși, precum și celule din țesuturile fixate și incluse în parafină, indiferent de vechimea lor. Notabil este faptul că metoda PCR a reușit să amplifice ADN izolat din mumiile egiptene și din frunzele fosilizate ale unor plante care au existat în urmă cu 18 milioane de ani. Chiar și un singur fragment ADN poate fi suficient pentru obținerea a miliarde de copii.

Simplitatea, rapiditatea, sensibilitatea și specificitatea deosebit de înalte sunt calitățile care au făcut ca reacția polimerizării în lanț să devină cea mai frecvent utilizată tehnică în toate domeniile științelor biologice. Singura condiție pe care o impune efectuarea tehnicii PCR este cea a cunoașterii secvențelor cu care amorsele trebuie să fie complementare; această informație- atunci când amorsele nu sunt disponibile ca produse comerciale- poate fi obținută din băncile de date. Sensibilitatea extremă a PCR (metoda detectează secvența specifică chiar dacă aceasta este prezentă în numai una din 10^5-10^6 celule) poate deveni un inconvenient, de altfel unicul, al acestei tehnici, deoarece crează riscul contaminării cu secvențe ADN prezente în laboratoare sub formă de aerosoli, provenite din amplificări anterioare (ampliconi). Metoda PCR se caracterizează prin marea ei capacitate de a se adapta unor scopuri foarte diferite. Această „versalitate“ a condus la apariția unor numeroase variante, dintre care pot fi menționate:

-reacția cantitativă a polimerizării în lanț permite măsurarea concentrației unor molecule specifice de ARN mesager, prezente doar în anumite populații celulare. Se pot obține informații cu privire nu numai la pattern-ul genelor active transcripțional într-un anumit tip celular, ci și reglarea posttranscripțională a activității acestora. Moleculele ARNm sunt mai întâi convertite de către reverstranscriptază în fragmente de ADN complementar care vor fi apoi amplificate prin PCR; nivelul lor este apreciat prin comparație cu cel general de amplificare a unei ținte martor;

-amplificarea seventelor *Alu* (Alu-PCR) furnizează un mijloc foarte simplu de identificare și izolare a ADN de origine umană. Secvențele *Alu* sunt elemente repetitive alcătuite din circa 300 perechi de baze, dispersate în întregul genom. Deși foarte variabile, elementele *Alu* conțin o secvență consens specifică omului. Amorsele complementare cu secvența consens produc amplificarea secvențelor dintre două elemente *Alu* adiacente, certificând astfel originea umană a ADN;

-reacția polimerizării asimetrice este destinată generării fragmentelor monocatenare care vor constitui obiectul secvențierii prin metode chimice.

Identificarea mutațiilor de novo, detectarea rapidă și precisă a mutațiilor cunoscute a fi implicate în determinismul bolilor monogenice și al predispoziției genetice la boli comune sunt astăzi de neconceput, fără aplicarea metodei PCR sau a uneia dintre variantele sale. Diagnosticul precoce și evaluarea prognosticului bolii canceroase reprezintă două dintre aplicațiile clinice majore ale metodei PCR.

CAPITOLUL VI

ORGANIZAREA PROCESULUI DE TRANSCRIERE GENETICĂ

1. INTRODUCERE — GENERALITĂȚI

Procesul de transcriere (transcripție) genetică (genică) reprezintă inițierea, alungirea (elongarea) și terminarea (terminalizarea) sintezei moleculelor de ARN celular prin care se asigură transferul informațional de la ADN la ARN, ca primă etapă în realizarea expresiei genice, adică în funcționarea unei gene date. În acest proces este utilizată drept matriță una din cele două catene ale duplexului ADN, în cadrul unei reacții de polimerizare de ribonucleotide trifosfat, catalizată de o enzimă numită TRANSCRIPTAZĂ, care este o ARN polimerază dependentă de ADN, numită simplu *ARN-polimerază.*

În procesul de replicare are loc transferul informațional de la ADN-parental la ADN-fiu, acesta reprezentând primul nivel de transfer informațional. El asigură continuitatea, și implicit conservarea, prin replicare, a informației genetice, de la o generație la alta. Transcripția realizează al doilea nivel de transfer informațional, cel de la ADN la ARN și ea are, prin excelență, un caracter funcțional, operațional și nu unul de conservare informațională, ca în replicare. Transcripția reprezintă prima etapă în funcționarea unei gene, funcționare care va conduce la manifestarea unui caracter ereditar specific.

Ca și în replicare, în transcripție, transferul informațional de la ADN la ARN are la bază funcționarea principiului unic și definitoriu pentru acizii nucleici și anume ***principiul complementarității de baze azotate***: Timina (T) din matrița ADN se va împerechea cu Adenina (A) ribonucleotidului ce va intra în molecula ARN în curs de formare, A cu U, G cu C și C cu G, astfel că, în final, secvența de ribonucleotide din molecula ARN va fi complementară aceleia din catena ADN ce a funcționat ca matriță. Această secvență de ribonucleotide din ARN are semnificație de mesaj genetic, dacă ARN sintetizat are calitate de ARN mesager (ARNm)- purtător al mesajului genetic de la genă la ribozomi, locul sintezei proteinice.

La ribozomi, ARNm dictează poziționarea diferiților aminoacizi în catena polipeptidică ce se sintetizează: diferiții aminoacizi vor fi incluși în catena polipeptidică, în funcție de secvența de ribonucleotide din ARNm, fiecare aminoacid specificat, respectiv poziționat în catena polipeptidică fiind codificat de către trei nucleotide succesive din ARNm. Acestea constituie o unitate de codificare genetică numită ***triplet de nucleotide*** sau ***codon***. Astfel, ARNm este singurul tip de ARN celular care este tradus, în sensul că, la nivelul ribozomului, secvența sa de ribonucleotide (mesajul genetic) va fi tradusă într-o secvența de aminoacizi a catenei polipeptidice ce reprezinta produsul final al genei structurale.

În procesul sintezei catenei polipeptidice devine funcțional ***codul genetic operațional***, adică cel transcris sub formă de mesaj genetic, în secvența de ribonucleotide a ARNm. ***Codul genetic informațional*** rămâne permanent în ADN, ca informație ereditară și este reprodus cu fiecare rundă de replicare a ADN.

Celelalte două tipuri de ARN celular-ARN de transfer (ARNt) și ARN ribozomal (ARNr)-sunt doar transcrise. Ele nu vor mai fi și traduse, deși joacă rol esențial în cadrul procesului de traducere (translație), asigurând transportul la ribozomi al aminoacizilor activați (cazul ARNt) sau potrivirea de așa manieră dintre ARNm și ARNt (cazul ARNr), încât codonii succesivi din ARNm să fie recunoscuți, cu mare specificitate, de către diferitele tipuri de ARNt.

În cadrul traducerii mesajului genetic se realizează cel de al treilea nivel de transfer informațional, acela de la ARNm la proteine.

Deși secvența de ribonucleotide a ARNm este prin ea înseși purtătoare de informație, ea nu reprezintă informație genetică propriu-zisă, deoarece ea nu se poate autoreproduce, nu se poate replica. Ea încapsulează un mesaj genetic, adică acel tip de informație care va dirija la nivelul ribozomului succesiunea aminoacizilor dintr-o catenă polipeptidică, după care va fi distrusă prin depolimerizare. Mesajul genetic va putea avea însă și valoare de informație genetică, dacă molecula de ARNm va fi utilizată ca matriță de către un sistem enzimatic, numit ADN-polimerază dependentă de ARN care se mai numește și reverstranscriptază. Acest sistem enzimatic este întâlnit în mod curent în genomul ribovirusurilor din familia Retroviridae, dar nu se exclude posibilitatea ca el să poată fi implicat și în unele procese celulare normale.

Ca proces molecular, transcripția are două aspecte esențiale: **enzimologia transcripției și semnalele de inițiere și de stopare ale procesului.** Dacă mecanismul enzimatic al transcrierii genetice fusese înțeles de multă vreme, studierea semnalelor de inițiere și terminare ale procesului a fost deosebit de dificilă, înainte de punerea la punct a tehnologiei ADN recombinant și a metodologiei de secvențiere. Aceste abordări moderne au permis înțelegerea semnificației semnalelor de inițiere și terminare a transcrierii genetice.

Caracteristicile chimice esențiale ale sintezei ARN sunt următoarele:

1. În condiții naturale, transcripția genetică are loc numai în interiorul celulelor;

2. Precursorii în sinteza ARN sunt cele patru ribonucleotide 5'-trifosfat (rNTP): ATP, GTP, CTP, UTP, riboza din fiecare ribonucleotid având în pozițiile C_2' și C_3' gruparea OH;

3. În cadrul reacției de polimerizare, un grup 3'-OH al unui ribonucleotid reacționează cu 5'- trifosfatul unui al doilea ribonucleotid. Odată cu realizarea unei legături fosfodiesterice, este eliminat pirofosfatul, exact ca în sinteza ADN;

4. Secvența de baze azotate din molecula ARN este determinată de secvența de baze din ADN. Fiecare bază adăugată la capătul în creștere al catenei ARN este selectată în funcție de capacitatea sa de a se împerechea cu aceea cu care este complementară, aflată în catena ADN, folosită ca matriță. Astfel, unei secvențe C, T, G și A, din ADN, îi corespunde o secvență G, A, C și U, în ARN nou sintetizat;

5. Molecula de ADN ce este transcrisă trebuie să fie în stare dublu-catenară, dar, pentru orice sector transcris, adică pentru orice cistron (gena funcțională) este aleasă doar o catenă, spre a servi ca matriță în sinteza ARN. Matrița ADN și catena ARN sunt complementare și antiparalele. Chiar și în cazul în care starea nativă a ADN este monocatenară, așa cum este cazul bacteriofagului φx174, transcripția genică nu poate avea loc decât atunci când acesta devine bicatenar, ca formă replicativă (RF), intermediară și obligatorie, din replicarea genomului acestui fag.

6. Catena ADN care funcționează ca matriță pentru sinteza unei catene ARN se numește ***catenă matriță*** sau ***catenă antisens***, deoarece polaritatea sa moleculară (3'→5') este opusă aceleia a catenei poliribonucleotidice (5'→3'), sintetizată pe ea. Catena complementară catenei matriță, adică aceea care nu este transcrisă în ARN, se numește ***catenă sens***, deoarece ea are aceeași polaritate moleculară cu catena poliribonucleotidică ce este sintetizată. În plus, ***catena sens*** a duplexului ADN are o succesiune de baze identică cu aceea din molecula ARN transcrisă, cu excepția faptului că în ARN, locul Timinei este luat de Uracil. Din această cauză, succesiunea tripletelor de nucleotide (codonilor) este identică în catena sens și molecula de ARN, astfel că această catenă sens se mai numește și ***catenă codificatoare*** (fig. 1). Convențional, catena matriță a duplexului ADN se notează cu semnul minus (-), pe când catena sens se notează cu semnul plus (+). Catena din ADN transcrisă nu este catenă matriță pentru toate genele. Excepție face

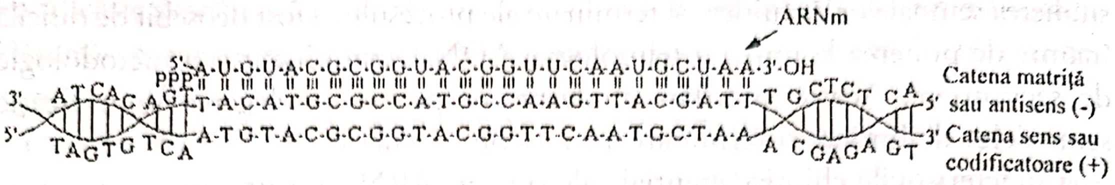

ARNm
5'-A-U-G-U-A-C-G-C-G-G-U-A-C-G-G-U-U-C-A-A-U-G-C-U-A-A-3'-OH
ppp
3'
A T C A C A G T-T-A-C-A-T-G-C-G-C-C-A-T-G-C-C-A-A-G-T-T-A-C-G-A-T-T-T G C T C T C A-5'
5'
T A G T G T C A-A-T G-T-A-C-G-C-G-G-T-A-C-G-G-T-T-C-A-A-T-G-C-T-A-A-A C G A G A G T-3'
Catena matriță sau antisens (-)
Catena sens sau codificatoare (+)

Fig. 1 — relația ADN–ARN în transcrierea genică (după Stryer, 1995).

genomul bacteriofagului φx174, la care toate speciile de ARNm cu specificitate fagică sunt transcrise de pe aceeași catenă a formei replicative dublu-catenare. Dimpotrivă, la fagul T_4 și una și cealaltă catenă complementară din ADN dublu catenar pot funcționa în calitate de catenă matriță, dar pentru diferite gene. Polimerizarea ribonucleotidelor în transcripție are totdeauna sensul de la 5'- la-3'. Sunt foarte rare instanțele în care ambele catene ale unui aceluiași sector ADN dublu-catenar, reprezentând o anumită genă, servesc ca matriță pentru sinteza a două molecule de ARN care vor fi complementare și implicate în reglarea activității genice (Singer și Berg, 1992). În cazul genelor suprapuse, ambele catene din aceeași regiune a ADN pot fi matriță pentru ARN-uri transcrise în direcții opuse;

7. Catena ARN crește în direcția 5'-3', adică ribonucleotidele sunt adăugate numai la capătul 3'-OH al catenei în creștere, ca și în cazul sintezei (replicării) ADN. Așa se explică de ce catena ARN și matrița sa ADN sunt antiparalele, una față de cealaltă; aceasta înseamnă ca matrița ADN ce este transcrisă are întotdeauna orientarea de la 3' la 5';

8. Spre deosebire de ADN polimerază, ARN polimeraza este capabilă de a iniția sinteza unei catene poliribonucleotidice și, în consecință, nu este necesar un primer pentru inițierea sintezei acesteia, așa cum se întâmplă în sinteza ADN, unde primarea este o etapă esențială în inițierea sintezei unei catene polideoxiribonucleotidice;

9. În sinteza ARN participă doar ribonucleotide 5'-trifosfat și prima bază care este pusă la temelia noii catene, în cadrul evenimentului de inițiere, este conținută într-un ribonucleotid care rămâne ca atare, adică sub formă de trifosfat, în molecula matură de ARN, dacă capătul 5' al acesteia nu este procesat. Grupul 3'- OH al acestui prim ribonucleotid este punctul de atașare a ribonucleotidului trifosfat următor, din care însă este eliminat pirofosfatul (P-P). Astfel, capătul 5'al unei molecule de ARN în creștere începe cu un trifosfat, restul ribonucleotidelor fiind sub formă de monofosfat.Numai dacă primul ribonucleotid se află într-un sector al transcriptului primar (molecula de ARN sintetizat pe matrița ADN și având lungimea acesteia) care va fi excizat sau modificat în cadrul prelucrărilor

post-transcripționale, molecula de ARN rezultată va avea la capătul 5' un singur grup fosfat.

10. Reacția generală de polimerizare de ribonucleotide (sinteza de ARN) este următoarea:

$$n \cdot NTP + \frac{ADN, ARN - pol}{Mg^{2+}}$$

$$(NMP)_n - XTP + N \cdot PPi$$

în care:

XTP – reprezintă primul ribonucleotid de la terminalul 5' al catenei ARN,

NMP– este un ribonucleotid monofosfat aflat în catena ARN,

ARN – pol este ARN polimeraza,

PPi este pirofosfatul ce este eliminat de fiecare dată, când un ribonucleotid este adăugat la catena în creștere.

Ionul Mg^{2+} este cerut în toate reacțiile de polimerizare de acizi nucleici.

Sinteza ARN constă în patru faze discrete, distincte:

1. legarea ARN polimerazei la matriță, într-un situs specific (regiunea de reglare);
2. inițierea transcripției, respectiv a sintezei catenei poliribonucleotidice;
3. alungirea (elongația sau elongarea) acestei catene;
4. terminarea sintezei catenei și eliberarea sa de pe matriță.

Porțiunea din ADN transcrisă sub acțiunea catalitică a ARN polimerazei se numește *unitate de transcripție.* Aceasta este delimitată de un PROMOTOR (urmat de un PUNCT START, reprezentând prima pereche de baze din ADN, aflată imediat înapoia promotorului și care este transcrisă) și de un TERMINATOR, la nivelul căruia încetează procesul de transcriere. Secvența aflată înaintea punctului start se numește ***secvența din amonte***, pe când aceea aflată după acesta se numește ***secvența din aval.*** Punctul start este notat convențional +1, baza dinaintea sa având poziția –1.

În redările convenționale, secvența din amonte este redată în stânga lui +1, pe când secvența din aval este redată în dreapta lui +1. ARN polimeraza desface dublul helix ADN la nivelul regiunii transcrise, formându-se astfel ***„ochiul de transcripție“***. Pe măsură ce transcripția se desfășoară, enzima și „ochiul de transcripție“ se deplasează de-a lungul ADN, având loc alungirea monocatenei ARN.

Descrierea fazelor transcripției genice poate fi ușor înțeleasă dacă se cunoaște structura ARN polimerazei.

Cel mai bine cunoscută este ARN polimeraza de *Escherichia coli.* Holoenzima ARN polimerazică este alcătuită din 5 subunități:

- două subunități α (alfa) identice;
- o subunitate β (beta);

- o subunitate β' (beta prim);
- o subunitate σ (sigma).

Greutatea moleculară a acestor subunități este de 36.500, 150.000, 160.000 și respectiv 70.000 daltoni, astfel că holoenzima ARN polimerazică are o GM de peste 400.000 daltoni, fiind una dintre cele mai mari enzime cunoscute până în prezent. La unele tulpini mai apare o subunitate auxiliară, adițională care s-a numit ε (epsilon) sau ω (omega). Aceasta are o GM=11000 daltoni și funcția ei este necunoscută. Fiecare subunitate este codificată de o genă distinctă, așa cum rezultă din tabelul 1.

Tabelul 1. Caracteristicile componentelor ARN polimerazei

Subunitatea	Gena	Numărul de catene polipeptidice	Masa moleculară (Kd)	Rol
α	rpoA	2	37	se leagă la secvențe reglatoare
β	rpoB	1	151	formează punți fosfodiesterice
β'	rpoC	1	155	se leagă la matrița ADN
σ^{70}	rpoD	1	70*	recunoaște promotorul și inițiază sinteza

Se cunosc mutante de *E.coli* care au alterate aceste subunități și care au fost desemnate: rpo A (α), rpo B (β), rpo C (β') și rpo D (σ). În anumite situații, s-au identificat și alte proteine asociate cu ARN polimeraza, dar pentru cele mai multe nu se știe ce funcții îndeplinesc.

Subunitatea σ se disociază ușor de holoenzimă. Cu termenul de **miez enzimatic** (*core enzyme*) se descrie holoenzima lipsită de subunitatea sigma, având deci formula stoichiometrică $\alpha_2\beta\beta'$. Enzima completă, adica **holoenzima**, are formula $\alpha_2\beta\beta'\sigma$.

ARN polimeraza este suficient de mare pentru a veni în contact simultan cu 20-30 perechi de nucleotide din ADN. Ea are următoarele dimensiuni aproximative : 190x95x160Å. Ea prezintă un „canal" sau o adâncitură de suprafață de 125 Å lățime, ce poate fi suportul pentru ADN. Lungimea acestuia permite adăpostirea a 16 perechi de nucleotide, la bacterii, și a 25 perechi de nucleotide, la drojdii, dar aceasta reprezintă doar un sector din duplexul ADN la care se leagă ARNpolimeraza, în cursul transcrierii. Utilizând-se metoda de protecție față de DNază, s-a realizat *footprinting*-ul regiunilor din ADN protejate de ARN polimerază, deoarece sectorul din ADN asociat cu ARN polimeraza este rezistent la acțiunea enzimei nucleazice (DNaza), putându-se astfel estima lungimea unui segment ADN, asociat cu această transcriptază ceea ce reprezintă în sine logica tehnicii *footprinting*. Când ARN polimeraza este legată de ADN, nici dimetilsulfatul (DMS), care metilează în mod specific A și G, nu mai poate realiza această acțiune de metilare.

Funcția subunității α (alfa) nu este cunoscută. Subunitatea β (beta) este implicată în legarea ribonucleotidtrifostaților și polimerizarea acestora. Subunitatea β' (beta prim) asigură legarea ARN polimerazei la ADN. Subunitatea σ (sigma) recunoaște promotorul și asigură inițierea corectă a transcripției. Ea conferă ARN polimerazei o creștere de 10^4 a afinității pentru regiunea promotorului, față de afinitatea pentru alte regiuni ale ADN. Holoenzima se leagă la duplexul ADN prin punți tranzitorii de hidrogen. Deplasarea enzimei pe duplexul ADN se face prin alunecare, nu prin legării și disocieri repetate. Enzima întâlnește situsul promotor prin plimbare randomică pe duplexul ADN.

Depinzând de faza de sinteză, o celulă de *E.coli* conține între 3.000 și 6.000 molecule de ARN polimerază. Când celulele cresc rapid, numărul de molecule de ARN polimerază atinge valoarea maximă.

2. SELECȚIA PROMOTORULUI

Prima etapă în transcrierea genetică este legarea ARN polimerazei la o moleculă de ADN, într-un situs particular al acestuia, care s-a numit PROMOTOR. Promotorul reprezintă o secvență specifică de 20 — 200 perechi de baze, la nivelul căreia apar numeroase interacțiuni. Asociindu-se cu promotorul, ARN polimeraza protejează duplexul ADN față de acțiunea endonucleazelor. Existența promotorului a fost pentru prima dată demonstrată prin izolarea unei clase particulare de mutante lac^- de *E.coli*. Aceste mutante lac^- nu numai că elimină activitatea genică, dar nici nu realizează complementația genică, adică sunt noncomplementabile, deoarece sunt cis acționare, ceea ce înseamnă că blochează transcrierea ADN la nivelul tuturor genelor lac^- care sunt situate în aceeași catenă matriță. Aceste mutații polare s-au mai numit și *mutații ale promotorului*.

ARN polimeraza trebuie să recunoască o secvență specifică din ADN și să se atașeze la aceasta într-o configurație adecvată, să deschidă duplexul ADN, spre a avea acces la secvența de baze pe care trebuie să o copieze și să inițieze sinteza catenei ARN. Aceste evenimente sunt ghidate de secvența de baze a ADN, de subunitatea σ *(sigma)* a ARN polimerazei (fără de care promotorul nu poate fi recunoscut) și pentru unii promotori, de proteine auxiliare.

Tehnica secvențierii ADN și ARN a permis să se identifice care secvență de la nivelul promotorului are valoare de situs de inițiere a catenei, această secvență existentă în ADN fiind transcrisă și apărând la începutul (capătul 5') al monocatenei ARN. Urmărind efectul mutațiilor la nivelul regiunii promotor, sau eliminând asemenea mutații, se poate stabili rolul specific al fiecărui sector din secvența promotorului.

Semnale discrete, bine delimitate, cu rol precis în inițierea și stoparea transcripției, sunt codificate în matrița ADN. Secvențele *consens* ale situsurilor promotoare nu sunt identice, dar ele au trăsături comune ce pot fi reprezentate printr-o secvență consens idealizată. Fiecare bază din secvența consens TATAAT se întâlnește la majoritatea promotorilor procariotelor. Până în prezent, au fost secvențiați numeroși promotori, în special la *E.coli* și la fagii săi, recunoscuți de ARN polimeraza de *E.coli*. Într-o regiune a promotorului, aflată în amonte de secvența genică transcrisă în ARN, la capătul 3' al acesteia, pe un sector de 5-10 nucleotide, pornind de la prima bază din ADN copiată în ARN și considerată +1, se află o secvență particulară, care s-a numit **secvența –10** sau **cutia lui Pribnow.** Toate secvențele aflate în *cutiile Pribnow* analizate la peste cei 100 promotori procariotici secvențiați până în prezent sunt variante ale secvenței de bază sau secvența consens — TATAATG, sau **cutia TATA**. Restul T subliniat, din cea de a șasea poziție a cutiei Pribnow, se află în toți promotorii secvențiați până acum și s-a numit T conservat. La eucariote cutia TATA se mai numește **CUTIA HOGNES** (fig. 2), fiind asemănătoare cutiei Pribnow, de la procariote, numai că este localizată ceva mai în amonte față de aceasta. Mulți promotori

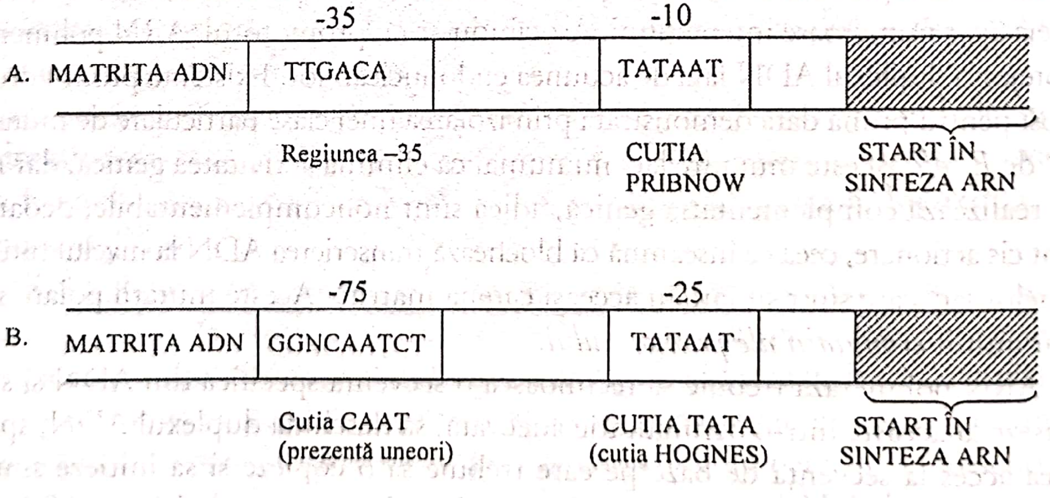


Fig. 2 — Structura promotorului la Procariote (A) și la Eurocariote (B) (modificat, după Stryer, 1995).

eucariotici au, de asemenea, o cutie **CAAT**, aflată la aproximativ –75. În plus, transcripția la eucariote este stimulată de o secvență numită **ENHANCER** ce se poate afla la distanțe foarte mari (până la câteva kilobaze) față de situsul start, fie pe partea 5', fie pe partea 3'.

În genomul bacterian, secvența minimă recunoscută ca promotor este de 12 perechi de nucleotide. Lungimea minimă necesară pentru o recunoaștere unică crește cu dimensiunea genomului. În toți promotorii se întâlnește o secvență de nucleotide care este conservată, dar care poate prezenta o oarecare variație la diferite specii. Situsurile potențiale de recunoaștere din ADN pot fi definite în termenii unei secvențe idealizate care reprezintă secvența consens. Aceasta rezultă prin alinierea tuturor secvențelor cunoscute, spre a maximaliza omologia lor. Pentru ca o secvență să îndeplinească condiția de a fi consens, trebuie ca fiecare bază particulară să fie rezonabil de predominantă în poziționarea sa într-un loc dat al secvenței, iar majoritatea exemplelor reale trebuie raportate la această secvență consens de care diferă doar prin 1 sau cel mult 2 substituții. Doar unele tronsoane scurte din secvența celor peste 100 de promotori secvențiați la bacteria *Escherichia coli* sunt conservate, dar tocmai acestea sunt esențiale pentru funcția promotorului și joacă rol vital în reglarea activității genice, la nivelul transcripției. Au fost identificate patru elemente conservate în promotorii bacterieni și acestea sunt următoarele: **punctul start, secvența –10 (cutia lui Pribnow), secvența –35** (al cărei element consens este TTGACA) și **distanța dintre –10 și –35.**

În peste 90% dintre cazurile analizate, punctul start este o purină, reprezentând baza centrală din secvența CAT. În amonte de punctul start apare o regiune de 6 perechi de baze, ușor de recunoscut în aproape toți promotorii. Acest hexamer este denumit frecvent secvența –10, datorită localizării sale. Secvența sa consens este TATAAT și poate fi redată $T_{80}A_{95}T_{45}A_{60}A_{50}T_{96}$, cifrele reprezentând procentul apariției bazei respective la cei 100 de promotori secvențiați. Se conservă TA inițial și aproape totdeauna T final din această secvență –10, acestea fiind și cele mai importante baze.

Un alt hexamer conservat este poziționat la –35 perechi de nucleotide, în amonte de punctul start, numindu-se **secvența –35**. Elementul consens al acesteia este TTGACA. Conservatorismul acesteia este $T_{82}T_{84}G_{78}A_{65}C_{54}A_{45}$.

Distanța dintre cele două secvențe variază între 15 și 20 perechi de nucleotide (la 90% dintre promotori aceasta este între 16 și 18 perechi de nucleotide). Această distanță este vitală în păstrarea celor două situsuri în stare separată, pentru rigorile de geometrie ale ARN polimerazei.

Promotorul optim constă dintr-un hexamer la –35, separat de 17 perechi de baze în amonte de punctul start (fig. 3).

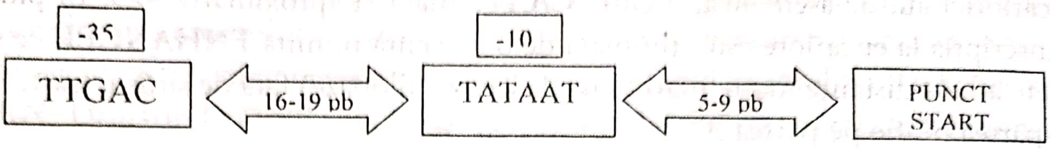


Fig. 3 — Poziționarea elementelor constitutive ale regiunii promotor.

Există unele variații ale acestei structuri standard a promotorului rezultate prin excluderea unei anumite nucleotide dintr-o poziție particulară, mai curând decât prin prezența acesteia în acea poziție.

Mutațiile în secvența promotorului afectează afinitatea acestuia pentru ARN polimerază. Mutațiile tip „**down**" în secvența –35 reduc rata formării complexului închis, pe când la nivelul secvenței –10 încetinesc conversia acestuia spre forma deschisă a complexului. Secvența –35 oferă semnalele de recunoaștere pentru ARN polimerază, pe când secvența –10 este legată de conversia de la *forma închisă* la *forma deschisă* a *complexului de inițiere*. Secvența –35 conține, așadar, *un domeniu de recunoaștere*, pe când secvența –10 cuprinde un domeniu de desfacere a dublului helix, deoarece ea conține exclusiv perechi de baze A=T; permițând „topirea" inițială a dublulu helix, cu un minimum de energie.

La *E.coli*, în covârșitoarea majoritate a promotorilor secvențiați, primele două baze din cutia Pribnow sunt TA, dar există și variante TG, CA, GA, și TC care rețin una dintre aceste două baze TA. Se crede că această cutie Pribnow reprezintă secvența care orientează ARN polimeraza, astfel ca sinteza să se desfășoare în direcția corespunzătoare, marcând regiunea în care se realizează deschiderea dublului helix ADN, spre a se forma **complexul cu promotor deschis.**

Cutia Pribnow este încadrată între –13 și –4, față de punctul start al transcrierii (+1), depinzând de promotorii specifici. Această numărătoare convențională a devenit standardizată. Mutațiile în cutia Pribnow blochează inițierea transcrierii, ceea ce reprezintă un indiciu al importanței acestei secvențe. Alte baze din afara cutiei Pribnow sunt în egală măsură importante. Examinarea secvenței complete a regiunii din ADN, protejată de către ARN polimeraza, indică faptul că dacă nu pentru toți, pentru mulți promotori, există o a doua regiune importantă în amonte de cutia Pribnow care, la diferiți promotori, are caracteristici comune. Aceasta s-a numit **secvența -35** (minus 35) și conține nouă baze, fiind considerată situsul inițial de legare a enzimei ARN polimerază, la ADN. Dar, de îndata ce se leagă la cutia Pribnow, ARN polimeraza se disociază de propriul situs de recunoaștere, aflat mai departe de cutia Pribnow. Complexul cu promotor deschis este a structură moleculară înalt stabilizată și reprezintă intermediarul activ în inițierea catenei ARN. În cadrul acestui complex are loc o desfacere, adică o denaturare fiziologică a dublului helix ADN, începând cu circa 10 perechi de baze, din amonte de cutia Pribnow, și se extinde spre poziția primei baze transcrise. Această „topire" a dublului helix ADN este necesară pentru împerecherea ribonucleotidelor libere cu deoxiribonucleotidele complementare din matrița ADN. Compoziția în baze a cutiei Pribnow (secvența bogată în perechi AT) facilitează denaturarea duplexului ADN, între A și T existând doar două punți de hidrogen. Se admite că însăși ARN polimeraza induce schimbarea conformațională a duplexului ADN, propice inițierii transcrierii corecte dar, în pregătirea prealabilă a acesteia (relaxarea stărilor superspiralizate) intervin numeroase alte proteine, printre care și topoizomeraza.

Există promotori de nivel înalt sau puternici, a căror recunoaștere de către ARN polimeraza este rapidă și atașarea acesteia la ei este fermă. Alți promotorii sunt „slabi", deoarece recunoașterea lor de către ARN polimerază nu este atât de rapidă și atașarea enzimei nu este atât de puternică. Numărul de molecule ARN sintetizate în unitatea de timp, la nivelul genelor cu promotorii slabi, este mult mai mic decât la nivelul celor cu promotori puternici. În consecință, genele cu promotori slabi vor dirija sinteza unui număr mai mic de molecule proteinice, în unitatea de timp. Astfel, puterea sau tăria promotorului este unul dintre factorii determinanți ai numărului de copii ale fiecărei molecule proteinice, prezente în celulă. În cele mai multe cazuri, examinate până în prezent, diferența dintre promotorii puternici și cei slabi se bazează pe diferențe în secvența –35.

Iată secvența diferiților promotori cu omologie, în regiunea –10 :

5’ -10 aici începe transcripția
A) CG**TATGTT**GTGTGGA A — operonul **lac** de E. coli
B) GC**TATGGT**TATTTCA B — operonul **gal** de E. coli
C) GT**TAACTA**GTACGCA C — operonul **trp** de E. coli
D) GT**GATACT**GAGCACA D — fagul lambda
E) GT**TTTCAT**GCCTCCA E — fagul φX174
TATAAT secvența consens

Informația pentru funcția promotorului este conținută în însăși secvența de nucleotide, structura sa reprezentând semnalul. Promotorul este un exemplu tipic de **situs cis-activator.** Spre deosebire de promotor, regiunile expresate din ADN dobândesc semnificația informației pe care o dețin în secvența lor de nucleotide, numai după ce această informație este transcrisă sub forma unui alt acid nucleic sau tradusă sub forma unei proteine.

3. SITUSUL CAP

Unii promotori sunt lipsiți total de secvența -35. Așa sunt promotorii λ*pre*, *gal I*, și *ara BAD*. Acești promotori sunt activi numai în prezența unor molecule efectoare pozitive. De exemplu, promotorul λ*pre* este activ numai atunci când este prezentă proteina λc II. Mecanismul de acțiune al acestor efectori nu este prea bine înțeles, dar studiul promotorului **lac** sugerează că ei se leagă la un situs aflat în regiunea de la nucleotidele 50 la 30, printr-un mecanism care diferă de cel utilizat, atunci când este prezentă această secvență. ARN polimeraza nu se leagă la ADN, până ce nu este prezent un factor *numit proteina receptoare sau acceptoare de AMP ciclic (cAMP)* care este desemnată CRP/CAP. Există două situsuri de legare CAP-cAMP, în promotorul lac, unul în segmentul de la 70 la 50 (situs I) și altul în segmentul de la 50 la 40 (situs II). Situsul I conține o secvență invers repetată de forma A B C D....D ' C' B' A' în care sensul « prim » denotă o bază complementară. Această secvență pare a fi caracteristică situsurilor de legare cele mai puternice. Situsul II este un situs de legare foarte slab, dar când un complex CAP-cAMP este legat la acest situs, capacitatea ARN polimerazei de a se lega la ADN este mult amplificată. De îndată ce situsul II este ocupat, ARN polimeraza se leagă strâns la secvența -35 și deci și la cutia Pribnow. Această stimulare de legare a ARN polimerazei are rol reglator foarte important, în multe sisteme. În absența CAP, ARN polimeraza se leagă la cutia Pribnow, dar rezultă un complex promotor închis, ceea ce face să nu aibe loc disocierea catenelor ADN, în regiunea de inițiere și deci nici inițierea transcripției. Secvența cutiei este TAT$\underline{\text{G}}$TTG. Prin cele trei punți de hidrogen efectuate cu baza complementară C, G subliniat poate crește stabilitatea împerecherii complementare, astfel că ARN polimeraza nu poate induce topirea. Legarea complexului CAP-cAMP destabilizează regiunea bogată în G = C din vecinătatea situsului I, facilitând intrarea ARN polimerazei în regiunea cutiei Pribnow și, în consecință, realizarea unui *complex binar cu promotor deschis*. Dovada în acest sens este adusă de mutanta *uv5* de *E. coli* la care apar două schimbări de baze G→A și T→A și are secvența TATAAG. Cu acest promotor se formează un complex cu promotor deschis, fără CAP.

Probabil, pierderea perechii GC interne reduce stabilitatea termică a secvenței și dă posibilitatea ARN polimerazei să disocieze dublul-helix ADN.

ARN polimeraza trebuie să identifice promotorul în păienjenișul de secvențe al genomului. Ea este legată ca miez enzimatic în diferite sectoare ale ADN genomic, iar atunci când mecanismele de reglare a activității celulare impun funcționarea (transcrierea) unei anumite gene, miezul enzimatic se asociază cu subunitatea sigma, mobilizându-se spre promotorul genei ce urmează a fi transcrisă. Subunitatea sigma are un domeniu cu ajutorul căruia recunoaște promotorul care se asociază puternic numai când se atașează la miezul enzimatic al ARN polimerazei. Ca polipeptid independent, factorul sigma nu se poate lega la duplexul ADN. Legarea inițială a ARN polimerazei la duplexul ADN se realizează pe un tronson care are 75-80 perechi de baze, între nucleotidele +55 și +20. Reacția holoenzimă — promotor începe cu formarea unui ***complex binar închis***, ceea ce înseamnă că ADN rămâne inițial ca duplex.

Complexul închis este convertit apoi într-un ***complex deschis*** prin *„topirea“* (denaturarea fiziologică) a unei mici regiuni din duplexul ADN, la nivelul regiunii la care este legată enzima. Complexul deschis se realizează printr-o legare strânsă a ARN polimerazei la ADN.

Încorporarea primelor două ribonucleotide, cu formarea unei legături fosfodiesterice dintre ele, printr-o reacție de condensare, cu atacul nucleofilic al 3'-OH al primului ribonucleotid asupra legăturii alfa a trifosfatului celui de al doilea ribonucleotid, conduce la formarea unui **complex ternar** la care participă ARN, ADN și enzima ARN polimerază.

Când inițierea este reușită, are loc eliberarea subunității sigma, realizându-se tranziția spre complexul ternar de elongație, în care ARN polimeraza participă prin miezul său enzimatic care rămâne legat la duplexul ADN. Când ARN polimeraza părăsește situsul promotor, o altă moleculă de ARN polimerază se angajează în procesul de inițiere, la un interval de o secundă.

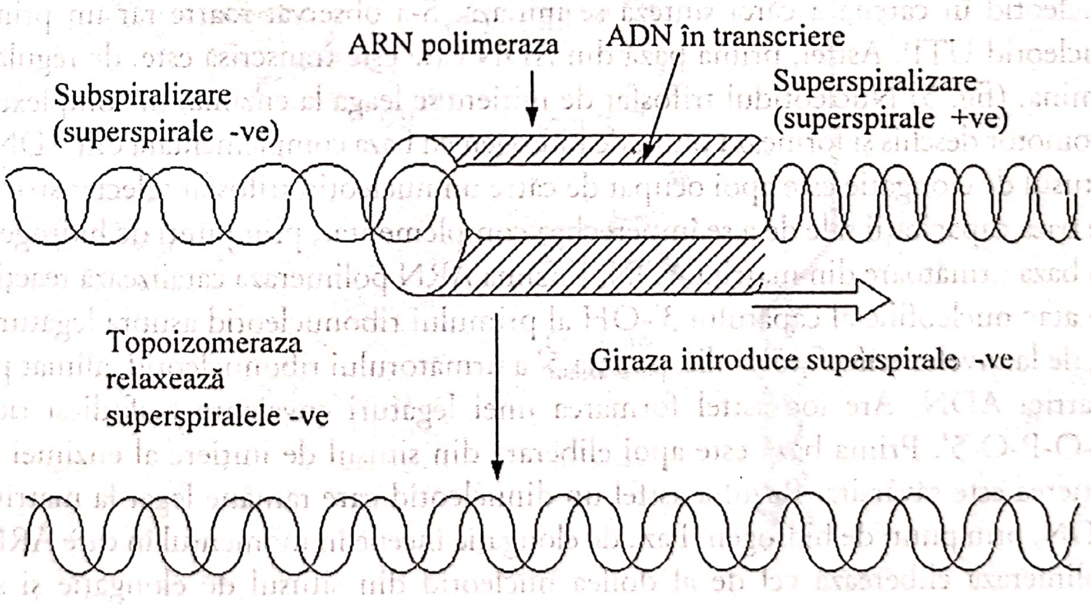

ARN polimeraza
ADN în transcriere
Subspiralizare
(superspirale -ve)
Superspiralizare
(superspirale +ve)
Topoizomeraza relaxează superspiralele -ve
Giraza introduce superspirale -ve

Fig. 4 — Modificări conformaționale ale dublului helix ADN în transcripție (adaptat, din Lewin, 2000) .

Uneori se întâmplă ca inițierea să fie abortivă. În acest caz, ARN polimeraza sintetizează oligoribonucleotide de 2-9 monomeri, după care reîncepe polimerizarea cu primul ribonucleotid.

„Modelul gemenilor“ în transcripție admite apariția unei subspiralizări, respectiv a unei superrăsuciri negative (superspirală –ve) în spatele ARN polimerazei (care înseamnă de fapt o desfășurare — relaxare — a dublului helix) și a unei superrăsuciri pozitive (superspirală + ve), în fața ARN polimerazei, așa cum se prezintă în figura 4.

Transcrierea are un efect semnificativ asupra structurii locale a ADN, ARN polimeraza generând un tur de superhelicare pozitivă în fața ei și un tur de superhelicare negativă în spatele ei. Pentru readucerea dublului helix ADN la o conformație normală, intervin enzime topoizomerazice. Astfel, giraza introduce superrăsuciri pozitive în ADN din fața ARN polimerazei, pe când, topoizomeraza I înlătură superrăsucirile negative, generate în spatele ARN polimerazei. Transcrierea generează superspiralizările în ADN celular.

4. INIȚIEREA CATENEI POLIRIBONUCLEOTIDICE

De îndată ce s-a format complexul promotor deschis, ARN polimeraza poate iniția sinteza ARN. Această enzimă are două situsuri de legare a nucleotidelor denumite *situsul de inițiere* și *situsul de elongație*. Situsul de inițiere leagă doar trifosfați purinici, adică ATP și GTP și unul din aceștia (de obicei ATP) este primul nucleotid în catena a cărei sinteză se inițiază. S-a observat foarte rar un prim nucleotid UTP. Astfel, prima bază din ADN care este transcrisă este, de regulă, timina. (fig. 5) Nucleotidul trifosfat de inițiere se leagă la enzimă, în complexul promotor deschis și formează punți de hidrogen cu baza complementară din ADN. Situsul de elongație este apoi ocupat de către un nucleotid trifosfat selectat strict, pe baza capacității sale de a se împerechea complementar, prin punți de hidrogen cu baza următoare din matrița ADN. Enzima ARN polimeraza catalizează reacția de atac nucleofilic al capătului 3'-OH al primului ribonucleotid asupra legăturii α, de la nivelul trifosfatului din poziția 5' a următorului ribonucleotid, aliniat pe matrița ADN. Are loc astfel formarea unei legături covalente fosfodiesterice 3'-O-P-O-5'. Prima bază este apoi eliberată din situsul de inițiere al enzimei și ințierea este săvârșită. Rezultă astfel un dinucleotid care rămâne legat la matrița ADN, prin punți de hidrogen. Faza de elongație începe în momentul în care ARN polimeraza eliberează cel de al doilea nucleotid din situsul de elongație și se deplasează de-a lungul catenei ADN, catalizând succesiv formarea de legături fosfodiesterice, cu sinteza unei catene poliribonucleotidice (fig. 6). Pe lângă situsul catalitic, ARN polimeraza are și un situs de legare a ARN nascent. Rata reacției

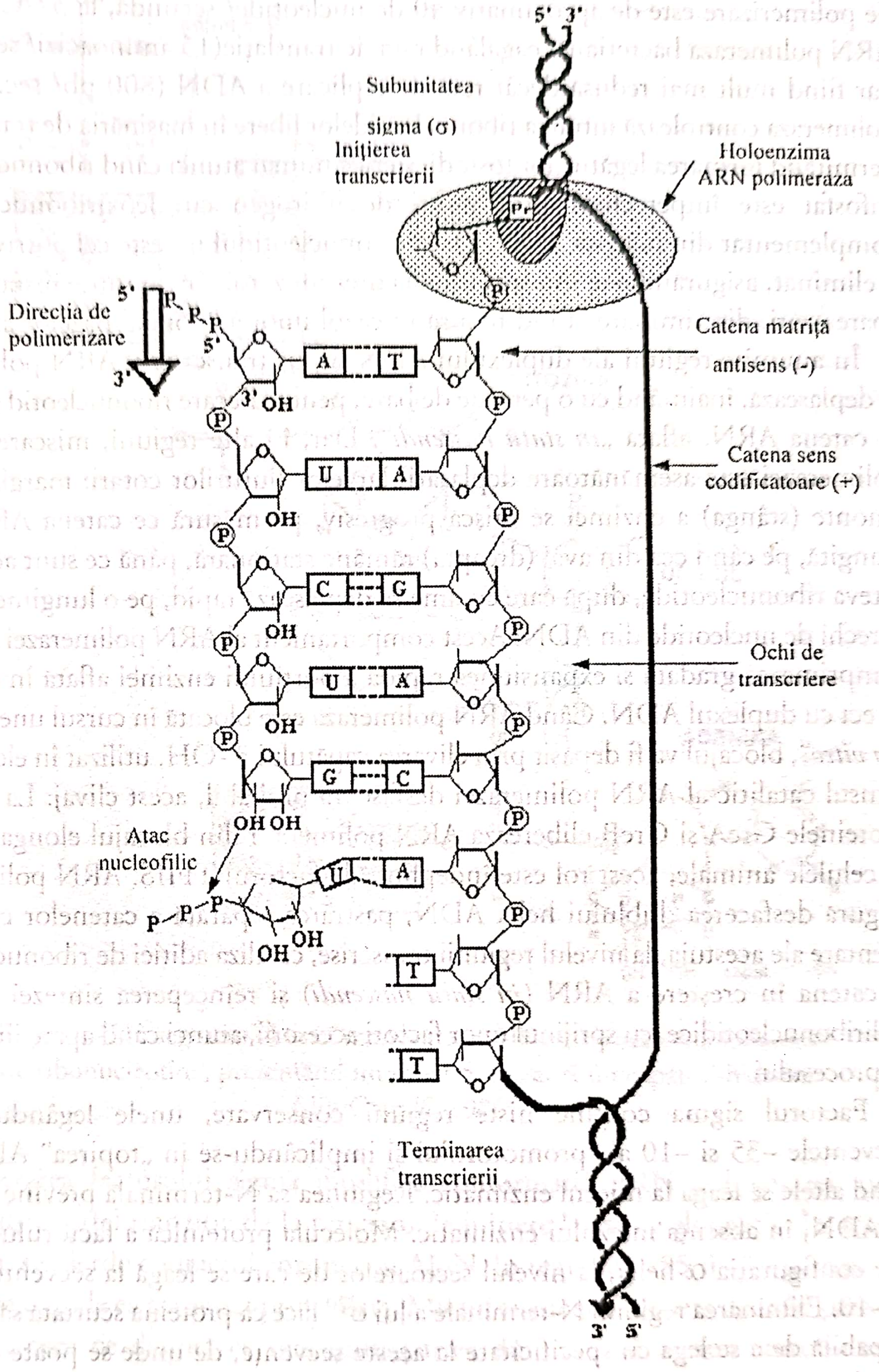

5' 3'
Subunitatea sigma (σ)
Inițierea transcrierii
Holoenzima ARN polimeraza
Pr
Direcția de polimerizare
5'
3'
P
P
P
5'
A
T
U
A
C
G
U
A
G
C
U
A
T
T
OH
OH OH
Catena matriță antisens (-)
Catena sens codificatoare (+)
Ochi de transcriere
Atac nucleofilic
Terminarea transcrierii
3' 5'

Fig. 5 — Schema transcrierii genetice. Suprafața hașurată reprezintă subunitatea sigma (σ) a enzimei bacteriene. Pr-promotorul; săgeata dublă reprezintă direcția de polimerizare (original).

de polimerizare este de aproximativ 40 de nucleotide/ secundă, la 37°C, pentru ARN polimeraza bacteriană, eagalând rata de translație(15 aminoacizi/ secundă), dar fiind mult mai redusă decât rata de replicare a ADN (800 pb/ sec.). ARN polimeraza controlează intrarea ribonucleotidelor libere în mașinăria de transcriere, permițând formarea legăturilor fosfodiesterice numai atunci când ribonucleotidul trifosfat este împerecheat prin punți de hidrogen cu deoxiribonucleotidul complementar din matrița ADN. Dacă ribonucleotidul nu este cel potrivit, el va fi eliminat, asigurându-se intrarea unuia corespunzător. În anumite instanțe, pot apare erori, discriminarea fiind redusă în cazul unor analogi ai bazelor azotate.

În anumite regiuni ale duplexului ADN supus transcrierii, ARN polimeraza se deplasează, înaintând cu o pereche de baze, pentru fiecare ribonucleotid adăugat în catena ARN, aflată „*in statu nascendi*". Dar, în alte regiuni, mișcarea ARN polimerazei este asemănătoare deplasării larvelor fluturilor cotari: marginea din amonte (stânga) a enzimei se mișcă progresiv, pe măsură ce catena ARN este alungită, pe când cea din aval (dreapta) rămâne staționară, până ce sunt adăugate câteva ribonucleotide, după care enzima se deplasează rapid, pe o lungime de 7-9 perechi de nucleotide din ADN. Acest comportament al ARN polimerazei implică comprimarea gradată și expansiunea rapidă a porțiunii enzimei aflată în contact direct cu duplexul ADN. Când ARN polimeraza este blocată în cursul unei reacții „*in vitro*", blocajul va fi depășit prin clivarea capătului 3'-OH, utilizat în elongație. Situsul catalitic al ARN polimerazei desfășoară probabil, acest clivaj. La *E. coli*, proteinele GreA și GreB eliberează ARN polimeraza din blocajul elongației, iar în celulele animale, acest rol este îndeplinit de factorul TFIIS. ARN polimeraza asigură desfacerea dublului helix ADN, păstrarea separată a catenelor complementare ale acestuia, la nivelul regiunii transcrise, cataliza adiției de ribonucleotide la catena în creștere a ARN (*in statu nascendi*) și reînceperea sintezei catenei poliribonucleotidice, cu sprijinul unor factori accesorii, atunci când apare un blocaj al procesului.

Factorul sigma conține niște regiuni conservate, unele legându-se de secvențele –35 și –10 ale promotorului și implicându-se în „topirea" ADN, pe când altele se leagă la miezul enzimatic. Regiunea sa N-terminală previne legarea la ADN, în absența miezului enzimatic. Molecula proteinică a factorului sigma are configurația α-helix, la nivelul sectoarelor de care se leagă la secvențele –35 și –10. Eliminarea regiunii N-terminale a lui σ^{70} face ca proteina scurtată să devină capabilă de a se lega cu specificitate la aceste secvențe, de unde se poate deduce implicarea acestei regiuni în blocarea domeniului de legare al factorului sigma la ADN. Cuplarea cu miezul enzimatic induce modificarea conformației factorului sigma, eliberându-se și de domeniul său de legare la ADN, acesta devenind activ.

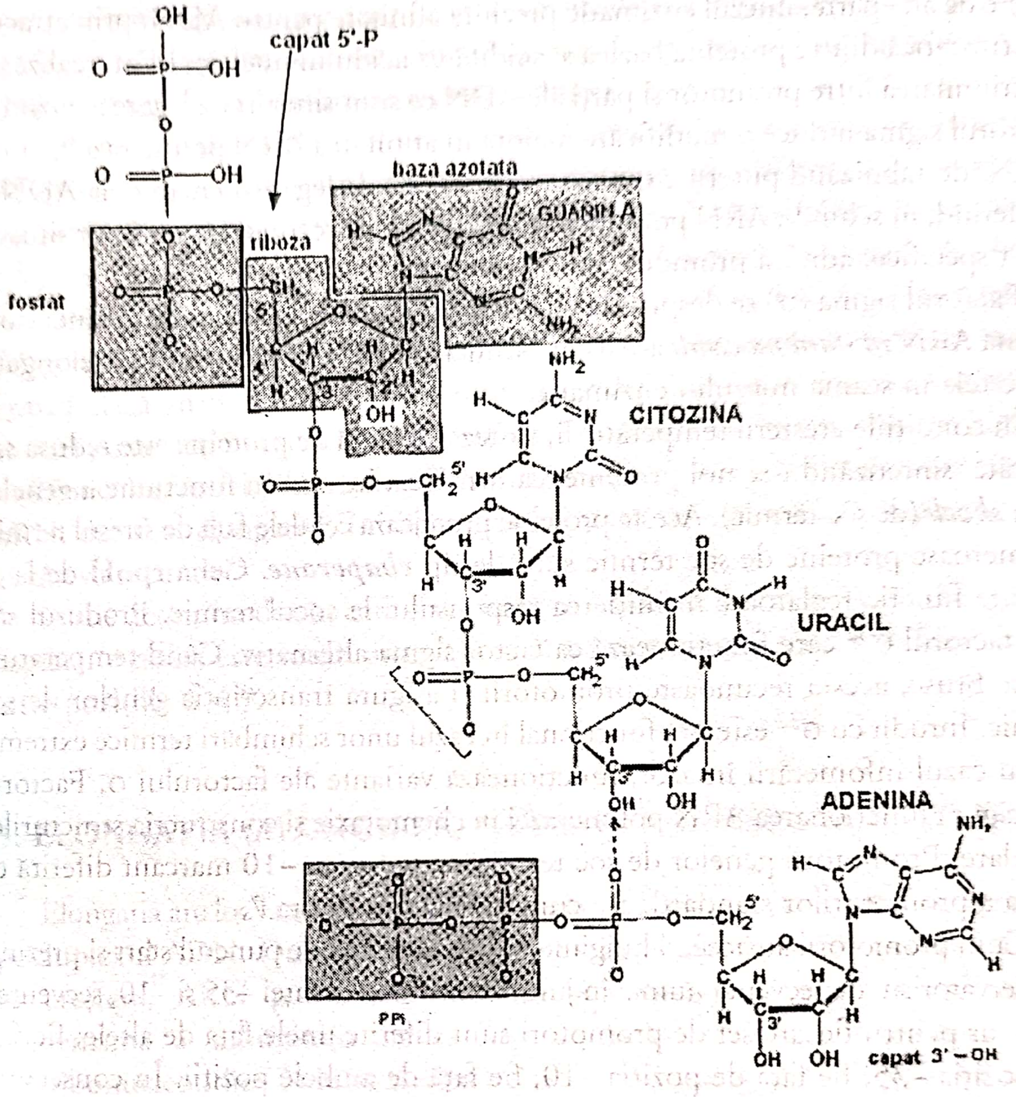


Fig. 6 — Un segment al unei monocatene ARN cu o secvență ipotetică de ribonucleotide, prezentând un capăt 5'-fosfat și un capăt 3'-hidroxil (din Gavrilă, 1986).

Eliberarea factorului sigma modifică conformația ARN polimerazei, permițându-se astfel tranziția de la procesul de inițiere la cel de elongație. În aceste condiții, se pierde contactul enzimei cu ADN, în regiunea –55 și –35 perechi de baze, acolo unde ea s-a atașat prima dată. Miezul enzimatic acoperă doar 60 perechi de baze, ceea ce denotă că mai mult partea din amonte a promotorului este implicată în recunoașterea inițială de către ARN polimerază.

Funcția factorului sigma este aceea de a asigura ca ARN polimeraza să se lege stabil la ADN, numai la nivelul promotorului, nu și al altor situsuri.

Pe de altă parte, miezul enzimatic prezintă afinitate pentru ADN, prin atracția electrostatică dintre proteina bazică și aciditatea acidului nucleic. El nu realizează discriminarea între promotor și părți ale ADN ce sunt situsuri de legare a enzimei. Factorul sigma induce o modificare majoră în afinitatea ARN polimerazei pentru ADN, destabilizând puternic capacitatea generală de legare a enzimei la ADN și conferind, în schimb, ARN polimerazei, capacitate de recunoaștere a unor situsuri strict specifice, adică a promotorului.

Factorul sigma (σ) se desprinde de holoenzima ARN polimerază, atunci când catena ARN *in statu nascendi* are 8-9 ribonucleotide, lăsând procesul de elongație a acesteia în seama miezului enzimatic.

În condițiile creșterii temperaturii, sinteza curentă de proteine este redusă sau blocată, sintetizându-se noi proteine, ca urmare a intrării în funcțiune a genelor ***heat shock*** (de șoc termic). Aceste proteine protejează celulele față de stresul termic. Numeroase proteine de șoc termic sunt de tip ***chaperone***. Gena **rpoH** de la *E. coli* are funcție reglatoare în inițierea răspunsului la șocul termic. Produsul său este factorul σ^{32} care funcționează ca factor sigma alternativ. Când temperatura crește brusc, acesta recunoaște promotorii și asigură transcripția genelor de șoc termic. Înrudit cu σ^{32} este σ^{E}, funcțional în cazul unor schimbări termice extreme.

În cazul înfometării în azot, funcționează variante ale factorului σ. Factorul σ^{F} asigură funcționarea ARN polimerazei în chemotaxie și construcția structurilor flagelare. Promotorii genelor de șoc termic au **secvența –10** marcant diferită de aceea a promotorilor standard, așa cum rezultă din figura 7.

Cum promotorii au aceeași lungime și localizare față de punctul start și prezintă conservatorism de secvență numai în jurul centrului secvenței –35 și –10, secvențele consens pentru fiecare set de promotori sunt diferite unele față de altele, fie față de poziția –35, fie față de poziția –10, fie față de ambele poziții. În consecință, o enzimă ce conține un anumit factor sigma poate recunoaște numai anumiți promotori, astfel că transcripția diferitelor grupe de promotori este reciproc exclusivă. Înlocuirea factorului sigma dintr-o holoenzimă cu un alt factor sigma

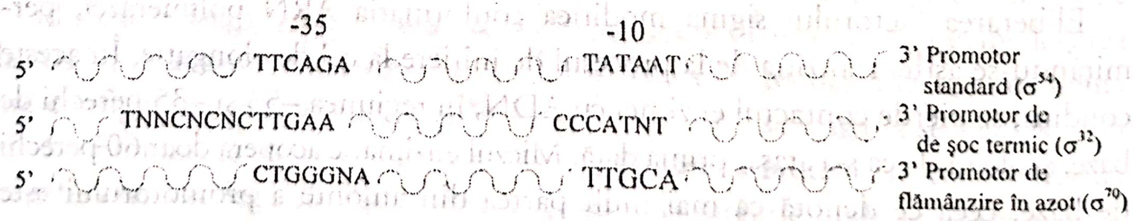

-35
-10
5'
TTCAGA
TATAAT
3' Promotor standard (σ^{54})
5'
TNNCNCNCTTGAA
CCCATNT
3' Promotor de de șoc termic (σ^{32})
5'
CTGGGNA
TTGCA
3' Promotor de flămânzire în azot (σ^{70})

Fig. 7 — Secvențele consens ale promotorilor standard, de șoc termic și de flămânzire în sursa de azot, la bacteria *E. coli* (după Stryer, 1995).

asigură transcrierea unui alt set de gene. Schimbarea subunității sigma are loc și în cadrul ciclului litic al infecției fagice, atunci când se trece de la funcționarea genelor timpurii, la funcționarea genelor târzii.

Subunitatea β a ARN polimerazei este implicată în formarea primei legături internucleotidice, adică a primei punți fosfodiesterice. Rifampicina SV este un antibiotic care se leagă strâns la subunitatea β a ARN polimerazei, împiedicând inițierea. De îndată ce s-a format dinucleotidul, legarea subunității β la situsul de inițiere nu mai este necesară. Antibioticul rifampicină, înrudit cu rifampicina SV, permite formarea dinucleotidului, dar blochează deplasarea enzimei pe matriță. Totuși, dacă un al treilea ribonucleotid fusese deja adăugat la catenă, rifampicina nu mai poate acționa și atunci elongația catenei ARN continuă, chiar în prezența antibioticului. Astfel, rifampicina SV și rifampicina sunt inhibitori ai inițierii catenei ARN, dar și ai elongației. Inițierea sintezei unei molecule ARN se poate realiza în câteva secunde.

Se știe acum modul în care este aleasă prima bază din matrița ADN, spre a fi copiată. Aceasta este totdeauna o Timină conservată din caseta Pribnow, aflată între pozițiile 6 și 9.

5. ELONGAȚIA (ALUNGIREA) CATENEI POLIRIBONUCLEOTIDICE

Elongația are loc la nivelul „ochiului de transcripție", pe când acesta se deplasează pe duplexul ADN. După ce sunt adăugate câteva ribonucleotide la catena ARN în creștere, ARN polimeraza își modifică structura, prin decuplarea din holoenzimă a subunității sigma (σ). În aceste condiții, alungirea catenei poliribonucleotidice cade în sarcina miezului enzimatic al ARN polimerazei.

Miezul enzimatic se deplasează de-a lungul moleculei ADN, legând un ribonucleotid trifosfat care se poate împerechea cu următoarea bază din matrița ADN, deschizând dublul –helix ADN, pe măsură ce se deplasează pe acesta, la nivelul „ochiului de transcriere" a cărei lungime variază între 12 și 20 perechi de nucleotide. Duplexul ADN se reînchide exact în spatele enzimei ARN polimeraza, refăcându-și structura sa nativă, bicatenară, helicoidală.

ARN nou sintetizat este eliberat din legăturile sale de hidrogen cu matrița ADN, pe măsura refacerii structurii dublu-helicoidale a ADN. Tratamentul cu RNază pancreatică a unui sistem de transcriere in vitro demonstrează că circa zece baze din ARN rămân protejate față de acțiunea acestei enzime nucleazice, ARN neasociat prin punți de hidrogen cu matrița ADN și cu ARN polimeraza fiind în mod specific depolimerizat.

ARN în curs de sinteză rămâne asociat prin punți de hidrogen cu matrița ADN, la nivelul a 2-3 nucleotide, după punctul de creștere, după care molecula de ARN *in statu nascendi* pătrunde într-un situs specific din ARN polimeraza, la care se leagă cu înaltă afinitate.

Faptul că doar una sau două baze din ARN pot rămâne împerecheate cu ADN, în cursul desfășurării procesului de elongație, este în contrast total cu lungimea de până la 50 de baze din ARN primer care rămâne împerecheat cu matrița ADN, în cursul procesului de primare a replicării ADN. Hibridul ADN-ARN este foarte scurt și tranzient, dar el conferă cursivitate procesului de elongație.

Reacția de elongație a catenei ARN nu decurge cu viteză constantă, ea încetinindu-se sau oprindu-se, atunci când sunt transcrise anumite regiuni, cu particularități specifice ale matriței ADN. Rata de reducere a transcrierii s-a numit PAUZĂ, dar nu se cunoaște nici cauza, nici semnificația sa. S-a observat că o asemenea pauză apare la circa 8 până la 10 baze, după ce s-a trecut peste o regiune bogată în G C. S-a dedus că alungirea catenei impune ca ARN mai înainte sintetizat să se disocieze de matrița ADN, o regiune bogată în GC formând un hibrid ARN-ADN mai stabil, de vreme ce la nivelul său sunt mai multe punți de hidrogen, ceea ce face ca o asemenea regiune bogată în GC să se constituie într-un fel de haltă în înaintarea enzimei ARN polimerază pe matrița ADN. Spre deosebire de ADN polimerază, ARN polimeraza nu realizează editarea catenei ribonucleotidice, aflată în curs de sinteză. În consecință, fidelitatea transcripției este mult mai redusă decât aceea a replicării. Rata erorii în sinteza ARN este de ordinul a 1 la 10^4 sau 10^5, adică de 10^5 ori mai înaltă decât aceea din sinteza ADN. Dar, o asemenea rată a erorii în transcripție nu are efectul negativ pe care l-ar avea în sinteza ADN, întrucât aceste erori nu se transmit în descendență.

6. TERMINAREA SINTEZEI CATENEI POLIRIBONUCLEOTIDICE ȘI ELIBERAREA ARN NOU SINTETIZAT

Terminalizarea sintezei ARN are loc la nivelul unor secvențe specifice de baze din matrița ADN ce constituie situsul terminator **t**, acesta conținând semnalele stop ale transcripției (Stryer, 1995). Cel mai simplu asemenea semnal este un palindrom cu perechi G–C, urmat de o regiune bogată în perechi A?T. Transcriptul ARN al acestui palindrom este autocomplementar, formând la terminalul 3' o structură hairpin, pe baza conținutului său bogat în GC. Structura hairpin este continuată cu o secvență de 4-6 resturi U, cu care, de fapt, se termină transcriptul ARN, la capătul său 3'. Când ARN polimeraza atinge în mersul său pe duplexul ADN acest situs **t**, ea încetează să mai adauge ribonucleotide la catena ARN, eliberează molecula completă de ARN și se eliberează ea însăși de pe matrița ADN. Posibilitățile actuale de secvențiere a acizilor nucleici au permis deslușirea unor caracteristici definitorii ale secvențelor terminatoare.

Mai întâi, s-a constatat că există o secvență de baze cu repetiție inversată, ce conține un segment central nerepetat. Într-o catenă a ADN, o asemena secvență s-ar putea citi astfel:

A B C D E F — XYZ — F’ E’ D’ C’ B’ A’

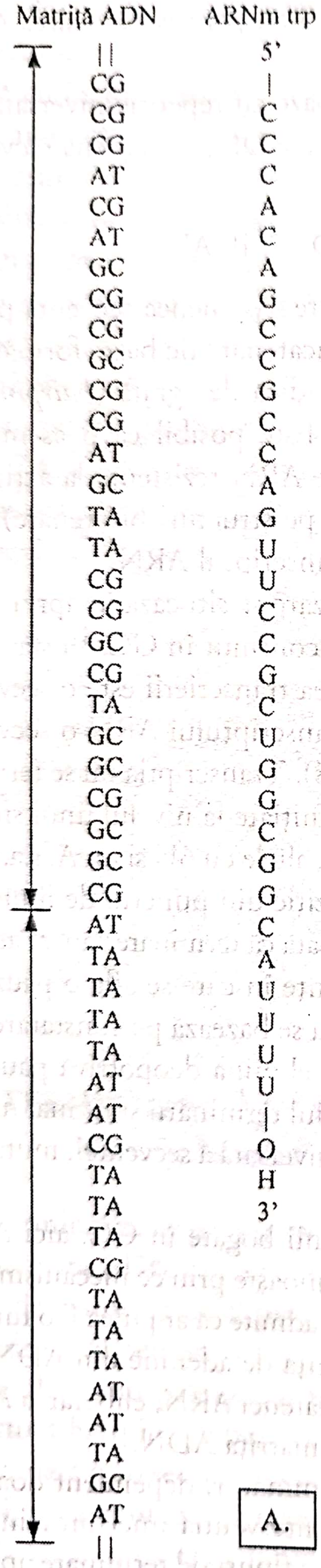
în care A și A’, B și B’, etc, sunt baze complementare. Asemenea secvență poate oferi posibilitatea de a se realiza o împerechere intracatenară de baze, formând o configurație în forma de **„o tulpină și o buclă“**, adică de agrafă (*hairpin*), în transcriptul ARN și, posibil, în catenele ADN. Este posibil ca o asemenea configurație să confere moleculei nou-sintetizate de ARN rezistență la acțiunea RNazei II (enzimă intracelulară care este inactivă pe structuri bicatenare). De aici rezultă că terminalizarea este dependentă de transcriptul ARN.

O a doua regiune posibil implicată în terminalizare se situează în apropierea capătului dinspre buclă al tulpinii, având un bogat conținut în GC. În sfârșit, o a treia regiune ce ar putea participa la terminalizarea transcrierii este o secvență de perechi AT, în matrița ADN, care generează transcriptului ARN o secvență de 6-8 resturi uracil, adesea urmate de adenină (fig. 8). Transcripția nu se termină la un situs unic. Într-o colecție de molecule ARN, inițiate la nivelul unui singur promotor, unele se termină cu 5 resturi U, altele cu 6, altele cu 6U și un A, ș.a.m.d. Baza finală este totdeauna între a 16-a și a 24-a poziție din punctul de mijloc al secvenței de terminare. Ipoteza acceptată în prezent arată că terminarea apare atunci când ARN polimeraza ajunge la nivelul unei secvențe în care se află o pauză în înaintarea acesteia și alungirea catenei ARN. Ipoteza se bazează pe constatarea că mutațiile apărute la nivelul secvenței de terminare elimină deopotrivă pauza și terminarea ca atare a transcripției. Se pare că la nivelul terminării sunt mai multe pauze și prima pauză se află în regiunea cu repetiție inversată a secvenței, mutațiile în această regiune reducând eficiența terminării.

O a doua pauză se pare că este la nivelul regiunii bogate în GC, aici ARN polimeraza având posibilitatea de înaintare. Nu se cunoaște prin ce mecanism este disociată ARN polimeraza de pe matrița ADN, dar se admite că ar putea fi o funcție a secvenței poli(U) care se leagă foarte slab la secvența de adenine din ADN.

Procesul terminării include încetarea elongației catenei ARN, eliberarea ARN nou-sintetizat și eliberarea ARN polimerazei de pe matrița ADN.

Sunt două tipuri de terminalizare: tipul autoterminator, dependent doar de secvența de baze din ADN, și tipul care necesită intervenția unei proteine de terminalizare care s-a numit factorul *rho* (ρ). Ambele tipuri de terminare apar la


Matriță ADN
ARNm trp
|| CG CG CG AT CG AT GC CG CG GC CG CG AT GC TA TA CG CG GC CG TA GC GC CG GC GC CG AT TA TA TA TA AT AT CG TA TA TA CG TA TA TA AT AT TA GC AT ||
5' | C C C A C A G C C G C C A G U U C C G C U G G C G G C A U U U U | O H 3'
A.

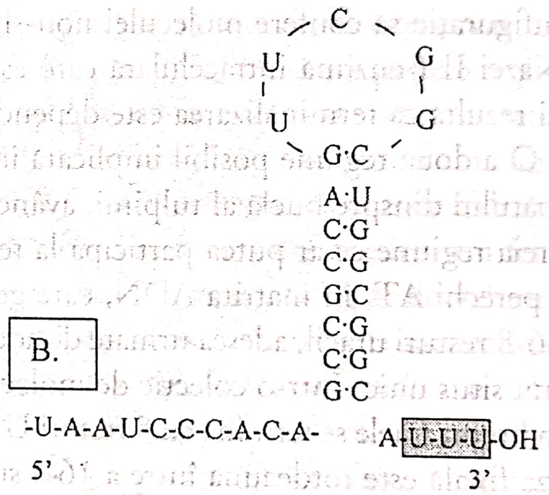

C
U
G
U
G
G·C
A·U
C·G
C·G
G·C
C·G
C·G
G·C
-U-A-A-U-C-C-C-A-C-A-
A-U-U-U-OH
5'
3'
B.

Fig. 8 — A. Secvența corespunzătoare terminalului 3' al ARNm pentru triptofan la *E. coli*. O axă de bisimetrie rotatorie marcată de săgeata este caracteristica palindromului existent aici. Porțiunea corespunzătoare transcriptului ARNm este redată în dreapta (după Stryer, 1995)

B. Formarea unei structuri stabile tip hairpin, la capătul 3' al transcriptului ARNm al genei trp de la *E. coli*, care se termină cu patru resturi U ce constituie partea semnalului de terminare a transcrierii.

secvențe specifice, distincte, de baze. Rho este o proteină care nu se atașează la miezul enzimatic sau la holoenzimă, ci se atașează foarte slab la ADN. În schimb, ea se leagă foarte strâns la ARN, dobândind o activitate ATP-azică foarte puternică. Factorul *rho* are o activitate foarte complexă, multifațetară.

Unii terminatori nu au necesitate absolută pentru **rho**, dar devin mai eficienți în prezența acestuia. Există și cazuri contrarii. De exemplu, ARNm 6S al fagului *lambda*, al bacteriei *E. coli*, eșuează uneori să realizeze terminarea în absența lui *rho*, totdeauna realizând însă terminarea, dacă *rho* este prezent. Dimpotrivă, ARN λ *oop* este totdeauna terminalizat, dar este eliberat mai rapid, atunci când *rho* este prezent. Factorul **rho** detectează semnale suplimentare de terminalizare, pe care ARN polimeraza singură nu le poate detecta. El accesează porțiunea hibridă ADN-ARN din ochiul de transcriere și induce denaturarea hibridului cu eliberarea ARN. Factorul ρ este o ATPază care hidrolizează ATP, în prezența ARN monocatenar, nu însă și în prezența ADN sau a ARN aflate în stare dublu-catenară. Factorul ρ este o proteină hexamerică care se leagă cu specificitate la capătul 5' al ARN monocatenar aflat spre sfârșitul sintezei sale. El leagă câte 12 ribonucleotide pe unitate, pe o lungime totală de 72 ribonucleotide (fig. 9),

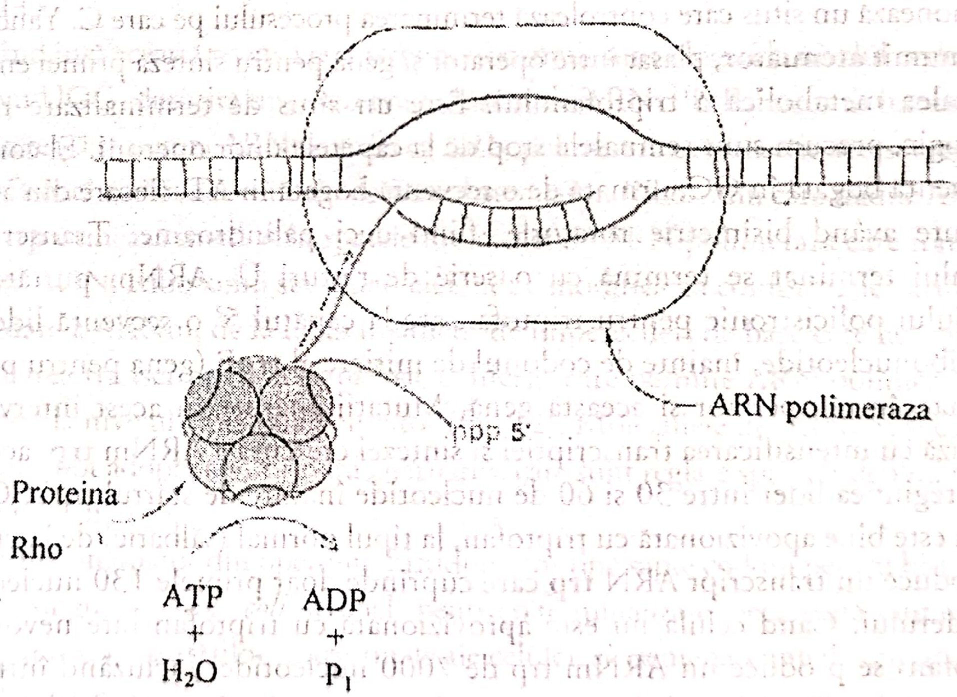


Fig. 9 — Model pentru terminarea transcrierii genice prin intervenția factorului ρ care se leagă la capătul 5' al catenei ARN născândă, aflată spre terminalizare, la capătul 3', spre care se deplasează acest factor, îndepărtând-o de matrița ADN și de ARN polimeraza (după Stryer, 1995)

și se deplasează dinspre capătul 5’ al ARN spre capătul 3’, asigurând desprinderea acestuia de matrița ADN și de ARN polimerază, la nivelul regiunii de terminalizare.

Activitatea ATPazică a lui ρ îl face să se deplaseze unidirecțional, de-a lungul ARN născând. Terminarea atât ρ-independentă, cât și ρ-dependentă a transcrierii genice are la bază semnale active ce se întâlnesc nu în matrița ADN, ci în ARN nou sintetizat, în care se află secvențe recunoscute de acest factor ρ sau de mecanismul de terminare independent de ρ. Absența unei simple secvențe consens face ca ρ să detecteze trăsături structurale străine și să nu fie eficient în terminarea transcrierii dependente de el.

Există și alte proteine care pot interveni în terminare. Astfel, proteina **musA** conferă ARN polimerazei de *E. coli* capacitatea de a recunoaște o clasă caracteristică de situsuri de terminalizare. Fagul lambda are gene pentru sinteza unor proteine antiterminatoare ce permit transcrierea și expresia anumitor gene. La *E. coli*, semnale specializate de terminalizare numite **atenuatori** sunt reglate potrivit necesităților nutritive ale celulei, acestea aflându-se de asemenea, în catena născândă a ARN. Astfel, în transcripția operonului **trp**, de la *E. coli*, funcționează un situs care controlează terminarea procesului pe care C. Yanovsky l-a denumit **atenuator**, plasat între operator și gena pentru sinteza primei enzime din calea metabolică a triptofanului. Este un situs de terminalizare reglat fiziologic, precum sunt semnalele stop de la capetele unor operoni. El conține o secvență bogată în GC, urmată de o secvență bogată în AT, fiecare din aceste secvențe având bisimetrie rotatorie, fiind deci palindroame. Transcriptul liderului terminat se termină cu o serie de resturi U. ARNm purtător al mesajului policistronic pentru triptofan are la capătul 5’ o secvență lider de 162 ribonucleotide, înainte de codonul de inițiere al **trpE** (gena pentru prima enzimă), între operator și această genă. Mutații apărute în acest interval se asociază cu intensificarea transcripției și sintezei crescută a ARNm **trp**, aceasta fiind regiunea lider între 30 și 60 de nucleotide înainte de startul trpE. Când celula este bine apovizionată cu triptofan, la tipul normal (sălbatic) de bacterie, se produce un transcript ARN **trp** care cuprinde doar primele 130 nucleotide ale liderului. Când celula nu este aprovizionată cu triptofan (are nevoie de triptofan) se produce un ARNm trp de 7000 nucleotide, incluzând întreaga secvență lider. De aici s-a dedus că operonul trp este reglat de un situs terminator numit ***atenuator***, localizat între operator și gena pentru prima enzimă din calea sintezei triptofanului.

Atenuarea este mediată de cuplarea intimă a transcripției și translației: când este suficient triptofan, inițierea transcripției genelor **trp** este blocată prin

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
Met – Lys – Ala – Ile – Phe – Val – Leu – Lys – Gly – Trp – Trp – Arg – Thr – Ser– Stop
5'-AUG-AAA-GCA-AUU-UUC-GUA-CUG-AAA-CGU-UGG-UGG-CGC-ACU-UCC-UGA-3'

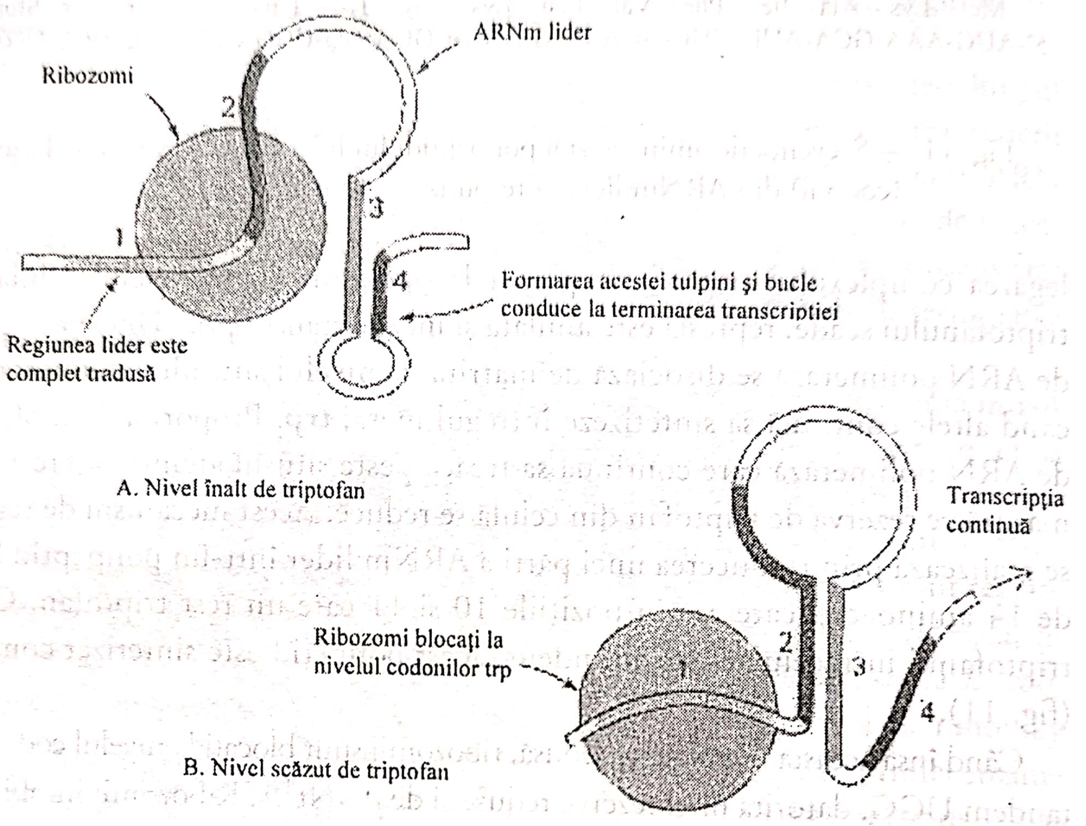
Fig. 11 — Secvența de aminoacizi a polipeptidului lider trp și secvența de baze (codoni) din ARNm lider corespunzător (după Stryer, 1995).

legarea complexului triptofan-represor la operator. Când nivelul celular al triptofanului scade, represia este anulată și începe transcripția. Unele molecule de ARN polimerază se disociază de matriță, la nivelul situsului atenuator, pe când altele continuă să sintetizeze întregul mesaj **trp**. Proporția de molecule de ARN polimerază care continuă să treacă peste situsul atenuator crește, pe măsură ce rezerva de triptofan din celulă se reduce. Acest mecanism de reglare se realizează prin traducerea unei părți a ARNm lider într-un polipeptid lider de 14 aminoacizi care are în pozițiile 10 și 11 câte un rest triptofan. Când triptofanul intracelular este abundent, acest polipetid este sintetizat complet (fig. 11).

Când însă această rezervă este redusă, ribozomii sunt blocați la nivelul codonilor tandem UGG, datorită unei rezerve reduse și de $ARNt^{Trp}$. Ribozomii imobilizați aici alterează structura ARNm, astfel că ARN polimeraza ce transcrie această regiune își desfășoară activitatea dincolo de situsul atenuator. Ribozomii care traduc **ARNm lider trp** urmează imediat în spatele moleculei de ARN polimerază care transcrie matrița ADN. Ribozomii staționați aici induc modificarea conformației structurii secundare a ARNm, de la un aranjament de împerecheri de baze care favorizează terminarea transcripției, la unul foarte diferit, care permite ARN polimerazei să transcrie la nivelul situsului atenuator (fig. 12). Moleculele de ARN, ca și cele de proteine, pot adopta conformații alternative care sunt reglate spre a îndeplini roluri fiziologice diferite.

Situsul atenuator din operonul histidinei conține șapte codoni pentru histidină, într-un singur șir. La *E. coli*, semnale pentru o terminalizare specializată sunt reglate în asigurarea necesităților nutriționale ale celulei, și asemena semnale active se află în ARN nascent.

Terminalizarea dependentă de *rho* este foarte importantă în procesele reglatoare, deoarece activitatea de terminalizare poate fi blocată prin intervenția unor proteine reglatoare care se numesc **antiterminatori**. Terminalizarea este adesea o consecință a inhibiției sintezei proteinice. Există și mutații care generează un nou



A. Nivel înalt de triptofan

B. Nivel scăzut de triptofan

ARNm lider
Ribozomi
2
3
1
4
Formarea acestei tulpini și bucle conduce la terminarea transcripției
Regiunea lider este complet tradusă
Transcripția continuă
Ribozomi blocați la nivelul codonilor trp
1
2
3
4

Fig. 12 — Modelul fenomenului de atenuare în cazul operonului **trp** de la *E. coli*. Când triptofanul este abundent (A) regiunea lider (segmentul 1) a ARNm lider este în întregime tradusă. Segmentul 2 intră în ribozom, care dă posibilitatea segmentelor 3 și 4 să se împerecheze. Această regiune de împerechere semnalează ARN polimerazei să realizeze terminarea transcripției. Când triptofanul este în cantitate redusă, ribozomul este blocat la nivelul codonilor trp, din segmentul 1. Segmentul 2 interacționează cu 3 în loc de a fi direcționat în ribozom, astfel că segmentele 3 și 4 nu se pot împerechea. Ca urmare, transcripția continuă (după Oxender, Zuranswki și Yanofsky, 1979).

situs de terminare, cu mult mai înainte de situsul normal de terminare, producându-se un ARNm mai scurt.

Asemenea mutații au fost caracterizate prin tehnici de cartare genetică și s-a constatat că sunt localizate într-un singur situs. Dacă un asemenea situs este într-o genă pentru o moleculă de ARNm policistronic, ele reduc activitatea tuturor genelor aflate în aval de mutație. Aceste mutații reprezintă o variantă a clasei de mutații polare. Explicația pentru acest tip de polaritate este aceea că genele din aval nu sunt transcrise, deoarece mutația a activat un situs de terminalizare prematură, așa cum s-a descris la *E. coli*, în cazul operonului *gal,* în care apar mutații desemnate Gal$^-$.

Etapa finală în procesul de terminalizare este disocierea miezului ARN polimerazei de matrița ADN. Acest miez enzimatic va fi „depozitat“ printr-o legare laxă la duplexul ADN, într-o regiune nespecifică, fiind ulterior reciclat și interacționând cu o subunitate σ liberă, reconstituind holoenzima ARN polimerază, activă într-o nouă rundă de transcriere genică, printr-o inițiere precisă, la nivelul promotorului. În unele cazuri, evenimentul de terminare este blocat de factori specifici care interacționează cu ARN polimeraza. Acesta este fenomenul de **antiterminare** care face ca ARN polimeraza să continue transcripția peste secvența terminatoare, realizând un fel de „trecere prin zid“ (“***readthrough***“), adică peste situsul terminator. Termenul de „***readtrough***“ este utilizat și pentru descrierea procesului prin care ribozomii trec peste codonii de terminare (codoni stop).

În infecția cu fag lamda (λ) a bacteriei *E. coli* intervine o proteină antiterminatoare, produs al genei fagice **pN**, dar care se leagă la ARN polimeraza bacteriană, astfel că aceasta nu mai poate recunoaște situsul de terminare.

In vitro, miezul enzimatic poate asigura terminarea transcripției la anumite situsuri, fără a interveni vreun factor de terminare. Asemenea situsuri se numesc **terminatori intrinseci.** Ei au un hairpin în cadrul structurii secundare și un tronson de 4-6 resturi U, situat chiar în capătul unității de transcripție. Regiunea tulpinală a *hairpin* conține mai multe perechi G–C. Structura *hairpin* este stabilă, iar ARN polimeraza încetează să se mai deplaseze pe matrița ADN, de îndată ce s-a realizat o asemenea structură. Dublul-helix hibrid ADN-ARN, produs după structura hairpin, este instabil, deoarece perechi de baze **rU–dA** sunt cele mai slabe dintre toate împerecherile de baze azotate. Ca urmare, ARN se disociază ușor de matrița ADN și apoi de ARN polimerază. Catena ADN rămasă solitară se reasociază automat, prin punți de hidrogen, cu catena complementară, refăcându-se structura nativă, bicatenară, a ADN.

Miezul enzimatic al ARN polimerazei, lipsit de subunitatea sigma prezintă o afinitate mult mai redusă pentru duplexul ADN, decât pentru monocatena matriță, astfel că are loc decuplarea sa de enzimă.

7. TIPURI DE ARN CELULAR

Se cunosc trei tipuri majore de ARN celular: ARN mesager (ARNm), ARN ribozomal (ARNr) și ARN de transfer (ARNt). Toate aceste trei tipuri de ARN sunt sintetizate pe matriță de ADN, secvențele transcrise fiind denumite cu termenul generic de gene AR. Aceste trei tipuri de molecule ARN au funcții foarte diferite dar, esențiale, în egală măsură, în sinteza proteinică. La eucariote, în afara acestor tipuri de ARN se mai descriu și alte tipuri de ARN cum ar fi ARN nuclear heterogen (hnARN), ARN nuclear de talie mică numit snARN, etc.

7.1 ARNmesager (ARNm)

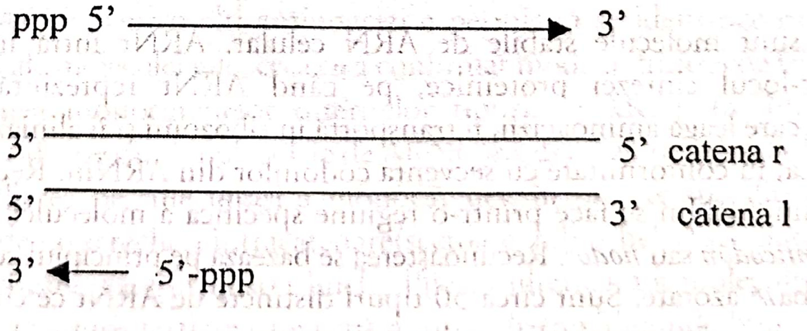
Deși secvența de aminoacizi din moleculele proteinice este determinată de secvența de baze azotate (gene) din ADN, aminoacizii nu au afinitate pentru ADN, astfel că ADN nu poate dirija direct poziționarea aminoacizilor în catenele polipeptidice. Între ADN și proteine se interpun procese intermediare, multistadiale, de transfer informațional. Prima etapă din cadrul acestor procese este transcrierea secvenței de baze azotate a uneia din cele două catene ale dublului helix ADN. Dacă secvența transcrisă codifică (poartă mesajul genetic) pentru sinteza unei proteine, atunci transcriptul ARN se numește ARN mesager (ARNm). Gena reprezintă segmentul din ADN ce deține informația genetică pentru sinteza unei catene polipeptidice, incluzând semnale start și stop ale translației. Un asemenea segment din ADN se mai numește CISTRON. Segmentul din ARN care corespunde unui cistron ADN se numește CADRU DE CITIRE, deoarece el este „citit“(decodificat, tradus) de mașinăria de sinteză proteinică, asociată ribozomului și funcțională în citoplasmă.

ARNm care poartă mesajul genetic pentru o singură catenă polipeptidică se numește **ARNm monocistronic**. Dar, la procariote, de regulă, o moleculă ARNm poartă mesajul genetic pentru mai multe catene polipeptidice diferite și, în acest caz, el se numește **ARNm policistronic**. De exemplu, la *E. coli*, pentru metabolizarea lactozei sunt necesare trei enzime, al căror mesaj genetic se află într-o singură moleculă de ARNm policistronic. Pentru sinteza histidinei, este necesară intervenția a nu mai puțin de zece enzime. Mesajul genetic pentru sinteza acestor zece enzime se află la nivelul unei singure molecule de ARNm policistronic. Utilizarea unui ARNm policistronic reprezintă o cale economică pentru ca o celulă să regleze sinteza unor proteine înrudite funcțional, de o manieră coordonată, în cantități similare și în același timp, utilizând un singur semnal de inițiere, pentru toate aceste proteine.

Lungimea moleculelor de ARNm este foarte variabilă, în funcție de mărimea mesajului genetic purtat și, în ultimă instanță, de lungimea catenei polipeptidice pe care o codifică. Cele mai mici proteine conțin circa 50 aminoacizi. În consecință, într-un ARNm monocistronic matur, vor fi necesare circa 150 nucleotide, potrivit relației de codificare 3 la 1, adică trei nucleotide (un codon) la un aminoacid. O proteină de dimensiune obișnuită are între 300 și 600 aminoacizi, ceea ce corespunde la 900-1800 nucleotide în ARNm. De regulă, la procariote, lungimea ARNm policistronic este între 3.000 și 8.000 nucleotide. ARNm policistronic pentru enzimele ce intervin în sinteza histidinei are 12.000 nucleotide.

Traducerea unui ARNm începe rareori exact la unul din capetele moleculei. Mai curând, inițierea sintezei primei catene polipeptidice de pe un ARNm policistronic poate avea loc la un punct aflat la sute de nucleotide de terminalul 5' al acestui mesager policistronic. Această porțiune netradusă a unui ARNm, aflată înaintea regiunii codificatoare, s-a numit LIDER. Uneori, liderul conține o regiune reglatoare numită ATENUATOR și aceasta determină rata sintezei proteinice. Nu numai la terminalul 5'-P, dar și la terminalul 3'-OH al unui ARNm policistronic se află secvențe netraduse. De asemenea, un ARNm policistronic, poate avea secvențe netraduse la nivelul joncțiunilor intercistronice. Aceste secvențe netraduse intercistronice pot avea lungimi de sute de nucleotide și se numesc SPACERS, adică SPAȚIATORI.

S-a stabilit că pentru o genă dată, o singură catenă a duplexului ADN este transcrisă în ARNm, dar pentru a altă genă, în calitate de catenă matriță, poate servi fie aceeași, fie cealaltă catenă a duplexului ADN. Cele două catene ale duplexului ADN pot fi desemnate catene l și r de la *left* (stânga) și *right* (dreapta), referindu-se la direcțiile de sinteză a ARNm, atunci când catenele ADN sunt descrise pe o cale standardizată sau arbitrară (orizontal): ARNm ce este sintetizat dinspre stânga spre dreapta este transcris de pe catena r. Potrivit acestei convenții creșterea ARNm are loc de la capătul 5' la capătul 3' și, deoarece, hibridul ADN-ARN este o structură antiparalelă, catena r a ADN este redată cu terminalul 3'-OH, la stânga:



ARNm este sintetizat ca moleculă monocatenară, dar el poate prezenta numeroase regiuni bicatenare care însă nu au fost evidențiate electronomicroscopic, fiind deduse pe baza constatării creșterii absorbției unei soluții de ARNm în ultraviolet, la lungimea de undă de 2.600Å, ca urmare a ridicării temperaturii acestei soluții ca și din faptul că RN-aza, activă doar pe structuri bicatenare, s-a dovedit a fi activă și pe un asemenea ARNm. Unele din aceste regiuni bicatenare ale ARNm reflectă semnalele de terminare din ADN. Ele servesc ca semnale în anumite etape ale sintezei proteinice și sunt rezultatul modificărilor posttranscripționale ale ARN, din cadrul procesării acestor molecule.

Durata de viață a ARNm procariot este scurtă, comparativ cu a altor molecule de ARN procariot. La bacterii, jumătatea de viață a unei molecule tipice de ARNm este de câteva minute și acest fapt are mare semnificație reglatoare: dacă celula nu mai are nevoie de o anumită proteină, ea poate să blocheze sinteza ARNm ce codifică pentru acea proteină. Pentru alte proteine, continuu cerute de celulă, se adoptă o sinteză continuă (constitutivă) de ARNm specific și de proteină care este necesară permanent celulei.

Durata scurtă de viață a ARNm bacterian este un criteriu utilizat spre a identifica ARNm la procariote. Identificarea ARNm se realizează și prin experiențe de marcaj pulsatoriu de urmărire: ARN este marcat rapid în bacteriile crescute în prezența uridinei tritiate (^{3}H-uridină), după care, bacteriile sunt trecute pe mediu neradioactiv. Moleculele stabile de ARN precum sunt cele de ARNr și ARNt vor fi identificate după marcajul radioactiv de-a lungul multor generații celulare bacteriene, pe când moleculele marcate de ARNm se vor diminua în 2-3 minute. Degradarea ARNm se realizează prin acțiunea ribonucleazelor (RN-aze), începând de la terminalul 5'-P. Aceste ribonucleaze sunt deci exonucleaze ARN; mai rar, ribonucleazele sunt endonucleaze ARN, adică inițiază depolimerizarea din mijlocul moleculei ARN.

7.2 ARN ribozomal (ARNr) și ARN de transfer (ARNt)

Acestea sunt molecule stabile de ARN celular. ARNr intră în structura ribozomilor-locul sintezei proteinice, pe când ARNt reprezintă molecule adaptatoare care leagă aminoacizii, îi transportă în ribozomi și îi aliniază în catena polipeptidică, în conformitate cu secvența codonilor din ARNm. Recunoașterea codonilor din ARNm se face printr-o regiune specifică a moleculei ARNt care s-a numit *anticodon* sau *nodoc*. Recunoașterea se bazează pe principiul complementarității de baze azotate. Sunt circa 50 tipuri distincte de ARNt ce corespund la cei 20 de aminoacizi principali care intră în structura proteinelor. Molecula de ARNt atașează la capătul său 3' aminoacidul specific activat, „încărcându-se“ cu acest aminoacid spre a-l transporta în ribozom. Acest proces poartă numele de

aminoacilarea ARNt. În ribozom, ARNt încărcat intră într-un anumit situs. La nivelul ribozomului, fiecare tip de ARNt este capabil de a recunoaște, și deci de *„a citi“* câte trei baze adiacente (triplet) din ARNm, treime care constituie o unitate de codificare biochimică-genetică, adică un *codon.* În ribozom este catalizată formarea punților peptidice dintre aminoacizii transportați succesiv aici, de către ARNt-uri.

Sinteza ARNr ca și a ARNt este inițiată la nivelul unui promotor și este terminată la nivelul unei secvențe terminatoare, ca și în cazul ARNm. Moleculele acestor două tipuri de ARN celular se termină cu un monofosfat 5' și nu cu un trifosfat, așa cum ar trebui să se întâlnească la capetele 5' ale tuturor transcriptelor primare. Aceasta deoarece, chiar și la procariote, asemenea molecule mature, funcționale, de ARNr și ARNt, derivă prin clivarea unor molecule precursoare corespunzătoare, care au avut la capătul lor 5' un trifosfat, dar acest capăt a fost eliminat în cadrul prelucrărilor posttranscripționale. Din această cauză, moleculele mature, funcționale, de ARNr și ARNt sunt mai scurte decât unitățile transcrise din matrița ADN, respectiv decât lungimea transcriptelor primare. În plus, toate moleculele de ARNt conțin baze „ neobișnuite“, adică baze diferite de cele tipice A, G, C, U, întâlnite în transcriptele primare. Toate aceste modificări moleculare sunt realizate după transcripție, în cadrul așa numitor modificări sau procesări (prelucrări) posttranscripționale, care au loc atât la procariote cât și la eucariote, dar cu diferențe specifice.

Existența ARNt, adică a unei molecule adaptoare între acizii nucleici și proteine, a fost intuită de către F.H.C.Crick. ARNt a fost izolat în anul 1957, de către M.W.Hoagland și colaboratorii, și reprezintă 10-25% din cantitatea totală de ARN celular.

În anul 1965, R.W.Holley, de la Universitatea Cornell(SUA), împreună cu colaboratorii săi,a descifrat secvența de nucleotide din ARNt pentru alanină, de la *Saccharomyces cerevisiae* și a elaborat modelul de structură secundară, cunoscut sub numele de modelul *„frunzei de trifoi“*. Analiza secvenței numeroaselor asemenea tipuri de ARNt pentru alți aminoacizi a permis să se identifice existența unor regularități ale moleculei sale, ceea ce a confirmat modelul frunzei de trifoi (fig. 13).

Lungimea monocatenelor diferitelor tipuri de ARNt are între 70 și 90 ribonucleotide, pe când moleculele de ARNt precursor au cu 30-40 ribonucleotide în plus. Plierea pe sine însăși a monocatenei, în puncte specifice, conduce la realizarea de împerecheri intracatenare(sectoare dublu-helix) separate de porțiuni neîmperecheate, care formează bucle. Plierea ulterioară a moleculei conduce la realizarea structurii terțiare care capătă forma literei T sau de bumerang.

Structura secundară are delimitate cele două capete 3'-OH și 5'-P. La capătul 3' se află o secvență CCA, la al cărei rest adenozină(A) este atașat aminoacidul activat corespunzător, potrivit relației de recunoaștere codon-anticodon. În toate moleculele mature de ARNt, la capătul 5' se află cel puțin un rest guanozină (G).

Prima buclă dinspre capătul 3' este *bucla timinei*. În ea se află un rest ribotimidilic, generat prin modificare chimică posttranscripțională a unui nucleotid obișnuit. Urmează apoi o buclă mai mică, numită *buclă variabilă*(V), formată dintr-un număr mic și variabil de ribonucleotide, uneori fiind chiar absentă. În cea de-a treia buclă, numită *bucla anticodonului* apare Inozina ca nucleotid neobișnuit. Cea de a patra buclă este *bucla dihidrouracilului*.

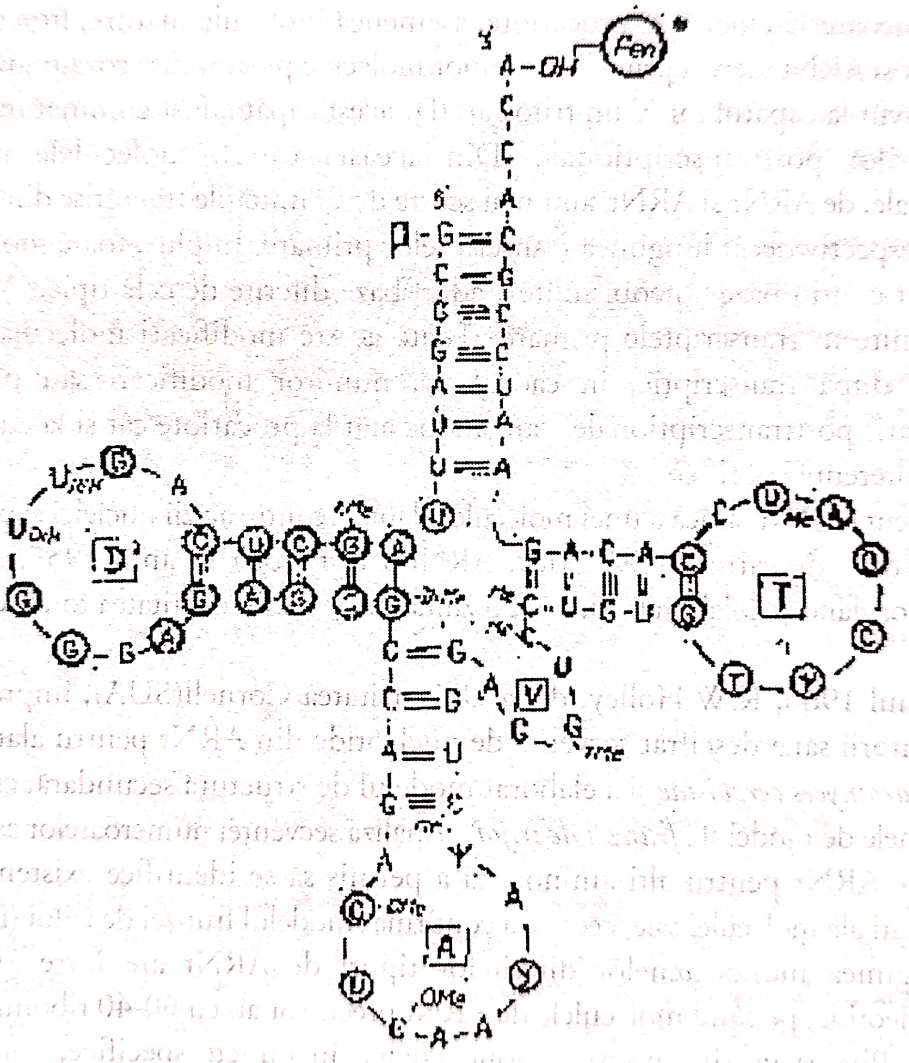


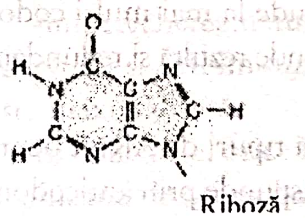
Fig. 13 — Structura ARNt pentru fenilalanina A- bucla anticodonului; D-bucla dihidrouracilului; T-bucla TΨC (a timinei sau a pseudoracilului); V-bucla variabilă; Bazele încercuite sunt invariante, în toate tipurile de ARNt; Y-purină modificată; Me-radical metil; DiMe-dimetilguanina; DiH-dihidrouracil; Ψ-pseudouridina; P-rest fosfat (după Holley și colab., 1965).

Prima buclă este implicată în relația ARNt cu ribozomul, pe când bucla a patra(sau a treia, acolo unde lipsește bucla variabilă) este implicată în recunoașterea de către enzima aminoacil-ARNt-sintetaza(aminoacil-ARNt-ligaza) a aminoacidului corespunzător unui anumit tip de ARNt și încărcarea acestuia cu un asemenea aminoacid, aflat în stare activată.

Pentru fiecare dintre cei 20 de aminoacizi există o ligază corespunzătoare. În conformitate cu principiile de codificare ar trebui să fie 61 de tipuri de ARNt, corespunzând la cei 61 de codoni sens din ARNm. Pentru unii aminoacizi, însă, există mai multe tipuri de ARNt și aceste tipuri de ARNt corespunzătoare pentru unul și același aminoacid se numesc *ARNt-uri izoacceptoare.* La *E.coli* sunt doar 30-40 de tipuri de ARNt, specificați de gene distribuite în diferite segmente ale cromozomului bacterian.

Genele pentru ARNt sunt în copii multiple, atât la procariote(40-80 copii genice), cât și la eucariote(220-1400 copii genice) și reprezintă între 0.002 și 0.004% din genom. În unele molecule izoacceptoare de ARNt se află ribonucleotide modificate, cu funcții speciale, cu rol de reglare a activităților metabolice.

Inosina este un nucleozid numit ribozil-hipoxantină care apare în bucla anticodonului ARNt. Ea se poate împerechea cu C,U și A, prin formarea a câte două punți de hidrogen, rezultând împerecheri diferite de cele Watson –Crick.



Originea chimică a inozinei în anticodon este foarte interesantă. Analiza secvenței de nucleotide la un număr mare de molecule de ARNt a arătat că nici un anticodon nu începe cu Adenina (A). Oricând A apare în prima poziție, într-un transcript ARNt nemodificat, ea este deaminată de o enzimă numită anticodon-deaminază, devenind hipoxantină. Așadar, hipoxantina este baza azotată a nucleozidului inozină. Toate resturile inozină din moleculele ARNt se formează pe această cale. Redundanța (degenerarea) codului genetic apare ca răspuns al unui anticodon la mai mulți codoni. Cel mai deosebit aspect al redundanței este acela că, cu puține excepții, identitatea celei de a treia baze din codon apare a fi neimportantă, ceea ce înseamnă că XZA, XZB, XZC și XZD sunt codoni sinonimi.

În anul 1965, Francis Crick a propus ipoteza *impreciziei* sau a *oscilării* (***wobble hypothesis***) spre a explica faptul că unele molecule de ARNt recunosc mai mulți codoni din ARNm, explicându-se astfel degenerarea codului genetic, redundanța sa. În acea perioadă, se admitea că în ADN au loc doar împerecheri G-C și A-T, iar în ARN, împerecherile sunt doar G-C și A-U. Într-adevăr, pentru ADN, în mod normal, nu sunt posibile decât împerecheri G-C și A-T. Deoarece structura helicoidală regulată a dublului helix ADN impune restricții sterice, nu se pot realiza împerecheri purină-purină sau pirimidină –pirimidină , deoarece, în primul caz, nu există suficient spațiu pentru o pereche plană purină-purină, iar în cel de al doilea, nu se poate realiza împerecherea, deoarece fiind mai mici dimensional, două pirimidine nu se ating reciproc, spre a se împerechia.

Crick a demonstrat că la nivelul buclei anticodonului, interacțiunea codon-anticodon nu impune constrângerile care apar la nivelul dublului helix, deoarece aici se află o structură monocatenară și împerecherea cu codonul formează un sector dublu catenar care nu trebuie să aibă dimensiunile obișnuite ale dublului helix. Cerințele sterice sunt mai puțin stringente, mai ales la nivelul poziției a treia a codonului. Permițând un mic joc în structură (acest joc este numit *wobble*), Crik a demonstrat că și alte perechi de baze se pot realiza între codon și anticodon. Spre a fi maximalizată stabilitatea, primele două perechi de baze sunt de tip obișnuit (Watson-Crick) sau standard, pe când a treia pereche de baze poate fi și de tip purină-purină, fără a produce prea mare distorsionare. Astfel, dacă în poziția a treia a codonului din ARNm se află A, acesta se poate împerechia cu U și I, aflate în prima poziție a anticodonului. Uracilul din poziția a treia a codonului se poate împerechia cu A, G și I aflate în prima poziție a anticodonului, iar citozina din poziția a treia a codonului se poate împerechia cu G și I, din prima poziție a anticodonului. Așadar, posibilitatea formării a trei perechi de baze A-I, U-I, C-I explică cum o singură moleculă de ARNt poate corespunde la mai mulți codoni din ARNm care codifică pentru un același aminoacid, de unde rezultă și redundanța sau degenerarea codului genetic.

La drojdie (*Saccharomyces cerevisiae*) s-au descris două tipuri de ARNt pentru Alanină (ARNt$_{I}^{Ala}$ și ARNt$_{II}^{Ala}$). Cel secvențiat de Holley răspunde prin anticodonul său IGC la codonii GCU, GCC și GCA. Este clar că doar Inozina (I) se poate împerechia deopotrivă cu U, cu C și cu A. Să reținem convenția că denominalizarea codonului se face totdeauna cu terminalul 5' la stânga. Astfel, codonul 5'-GCU-3' este împerechiat cu anticodonul 3'-CGI- 5', din bucla anticodonului. Similar, cel de al doilea ARNt pentru alanină (ARNt $_{II}^{Ala}$) răspunde doar la codonul GCG, ceea ce înseamnă că el are la anticodon secvența CGC. Codonul și anticodonul sunt antiparaleli. Astfel, codonul 5'-GCU-3' se împerechează la nivelul ribozomului cu anticodonul 3'-CGI-5'. Nici un ARNt nu are la anticodon secvența 5'-UUA-3' care ar corespunde codonului 3'-AAU-5'din ARNm, care reprezintă în reprezentarea convențională 5'→3' codonul stop UAA. Așa se explică de ce codonii UAA și UAG sunt codoni stop. Tot astfel, nici codonul 5'-UGA-3' nu este recunoscut de niciun ARNt, din care cauză el are valoare de codon nonsens sau codon stop.

Ipoteza *wobble* explică aranjamentul sinonimiilor în codul genetic. Fiecare codon care începe cu A este redundant, ceea ce explică de ce mai multe molecule diferite de ARNt pot să corespundă la un același aminoacid. Singurii codoni neredundanți sunt codoni AUG, pentru metionină și UGG, pentru triptofan.

La *Escherichia coli,* și probabil și la alte organisme, în poziția *wobble* (prima poziție) din anticodonul ARNt pentru Valină a fost descoperită o bază modificată numită acidul 5-oxiacetic uridină care se poate împerechia cu U,A și G. La alte organisme și la alte tipuri de ARNt, în anticodon, în poziția *wobble,* apare o altă bază modificată și anume 2-tiouridina care se împerechiază numai cu A. Prima bază în anticodon suferă deci modificare, ceea ce generează o specificitate de împerechere de baze, fie mai mică, fie mai mare.

Diferențele în prima poziție a diferiților anticodoni determină mai curând diferențe în numărul diferitelor molecule de ARNt care corespund la un anumit aminoacid. În cazul împerecherii codon-anticodon mai mulți factori contribuie la stabilitatea legării anticodonului la codon și anume:

-plierea moleculei ARNt și compactarea buclei anticodonului care determină ca bazele anticodonului să fie stocate și deci bucla să manifeste o mai mare stabilitate;

-prezența unui rest U în spatele părții 5' a anticodonului tuturor moleculelor de ARNt, ceea ce sugerează că acesta este implicat în funcția anticodonului — probabil în interacțiunea codon-anticodon;

-împerecherea naturală a codonului și anticodonului numai atunci când atât ARNt cât și ARNm sunt legați la ribozom, astfel că legarea anticodonului la codon este maximalizată.

În concluzie, orice moleculă de ARNt citește fie unul, fie doi, fie trei codoni, depinzând de prima bază a anticodonului numită bază *wobble* care poate fi C sau A (1 codon) sau o bază modificată (3 codoni). Redundanța codului genetic este cauzată în parte de oscilarea sau jocul, respectiv relaxarea sau imprecizia (*wobble*) în împerecherea celei de a treia baze din codon cu prima bază din anticodon.

Bazele modificate au apărut probabil în cursul evoluției, în poziția *wobble,* deoarece ele au maximalizat numărul codonilor care pot fi citiți de o singură moleculă de ARNt și au redus efectul deletoriu al mutațiilor, de la nivelul ADN.

Stabilitatea oricărui tip de moleculă, fie ADN, fie ARN, ce constă doar din două trinucleotide complementare este foarte mică. Aceasta devine progresiv mai mare, cu creșterea lungimii structurii dublu-catenare, prin contribuția forțelor de stocare a perechilor de baze complementare.

8. PROCESAREA MOLECULELOR PRECURSOARE DE ARNt

Acest mecanism este cel mai bine înțeles în cazul ARNt de la *E. coli* care transferă la ribozom aminoacidul tirozină și care prin anticodonul său recunoaște din secvența ARNm codonul GAU. El este desemnat tRNA ^{Tyr} sau în scrierea românească, ARNt^{Tyr}. Gena (segmentul de ADN) pentru acest tip de ARNt se află în cromozomul bacteriei, în două copii adiacente, fiecare cuprinzând o secvență identică de 350 nucleotide. Cele două copii genice sunt transcrise ca o singură moleculă de ARN care, după terminarea transcrierii, este tăiată. S-a stabilit că transcrierea genetică începe la un punct situat la 41 de nucleotide înainte (în amonte) de capătul 5' al secvenței de baze ARNt, iar situsul dependent de factorul Rho este la 224 nucleotide, în aval de capătul 3' al moleculei ARNt pentru tirozină. Rezultă că transcriptul primar este cu mult mai lung decât molecula funcțională de ARNt. Acest transcript este supus următoarelor prelucrări post-transcripționale:

1. formarea unui terminal 3'-OH. Acest proces implică acțiunea unei endonucleaze, care recunoaște o buclă de tip hairpin (agrafă), și a unei exonucleaze, care recunoaște o secvență de trei baze, totdeauna aceeași-CCA. După digestia endonucleazică (hidroliza legăturilor fosfodiesterice) sunt înlăturate 7 baze în amonte, prin acțiunea exonucleazică a RN-azei D. Aceasta mai lasă două baze la capătul 3'-OH, pe care însă le va înlătura, dar numai după procesarea capătului 5'-P;

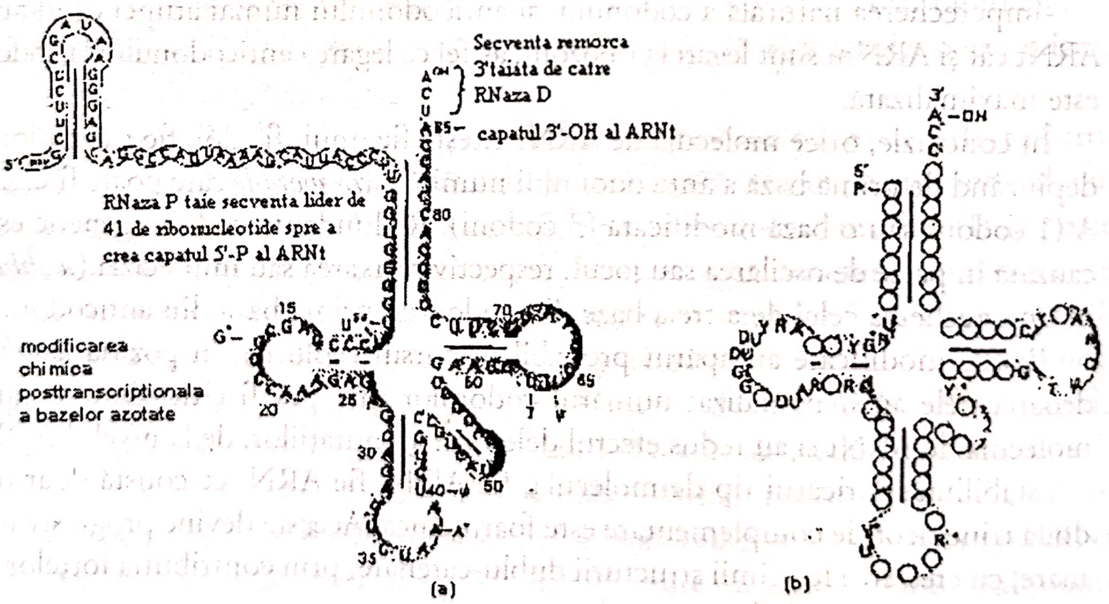

Secventa remorca
3'taiata de catre
RNaza D
capatul 3'-OH al ARNt
RNaza P taie secventa lider de
41 de ribonucleotide spre a
crea capatul 5'-P al ARNt
modificarea
chimica
posttranscriptionala
a bazelor azotate
5'
85
80
70
65
60
50
40
35
30
25
20
15
(a)
3'
A-OH
5'
P
(b)

Fig. 14 — Molecula precursoare de ARNt (a) și molecula matură de ARNt (b) rezultată în urma prelucrărilor posttranscripționale: Y-pirimidină; R-frecvent purină; Du-frecvent dihidrouridină; *-bază modificată, T-ribotimidină; Y-pseudouridină (din Freifelder, 1986).

2. formarea unui terminal 5'-P. Acest proces este realizat prin intervenția RN-azei P, care generează capătul 5'-P, la toate moleculele de ARNt, de la *E. coli*. Enzima acționează endonucleolitic și generează un terminal 5'-P corect, fragmentul rezultat fiind degradat sub acțiunea exonucleazelor, nucleotidele rezultate fiind reciclate (fig. 14). RN-aza P nu recunoaște secvențe specifice, ci mai curând ea recunoaște numeroase bucle hairpin, plasând tăietura exact la locul recunoscut după asemenea bucle. De îndată ce terminalul 5'-P a fost realizat, RN-aza D înlătură și cele două nucleotide de la terminalul 3'-OH și astfel rezultă molecula matură, funcțională, de ARNt^{Tyr};

3. modificarea chimică a bazelor azotate din ARNt se realizează prin intervenția unor enzime înalt specializate, care acționează asupra acestora, cu o strictă specificiate de situs. Astfel, în cazul ARNt pentru tirozină, două uridine sunt convertite la pseudouridină (ψ), alte două uridine, la 4-thiouridina (4tU), o

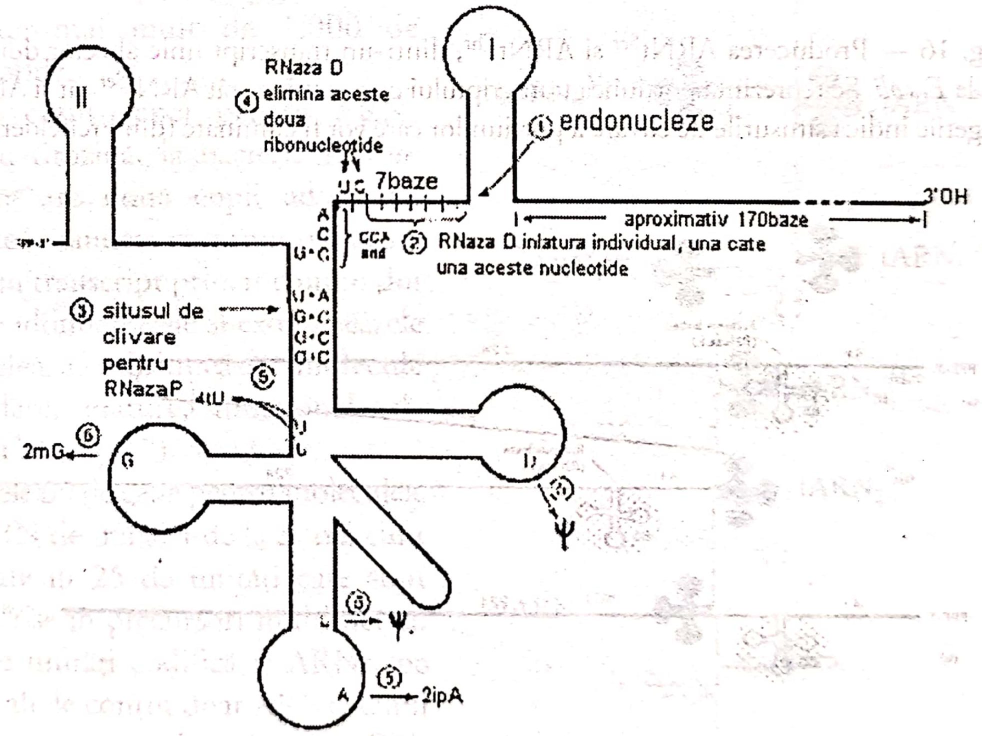

II
I
RNaza D
④ elimina aceste
doua
ribonucleotide
① endonucleze
U C
7baze
3'OH
A
C
G•C
CCA
and
② RNaza D inlatura individual, una cate
una aceste nucleotide
aproximativ 170baze
③ situsul de
clivare
pentru
RNazaP
U•A
G•C
G•C
G•C
⑤
4tU
U
U
⑥
2mG
G
D
③
ψ
U
⑤
ψ
A
⑤
2ipA

Fig. 15 — Cinci stadii succesive în procesarea transcriptului primar al genei pentru ARNt pentru tirozină.Aceste stadii sunt redate în numere arabe. Etapa a treia generează capătul 5'-P.Etapa 4 generează capătul 3'-OH. În cea de a cincea etapă sunt modificate șase baze azotate aflate în, sau în apropierea buclelor moleculei ARNt, spre a forma pseudouridina (ψ),2-isopenteniladenozina (2ipA), 2-O-metilguanozina (2mG) și 4-tiouridina (din Freifelder, 1986)

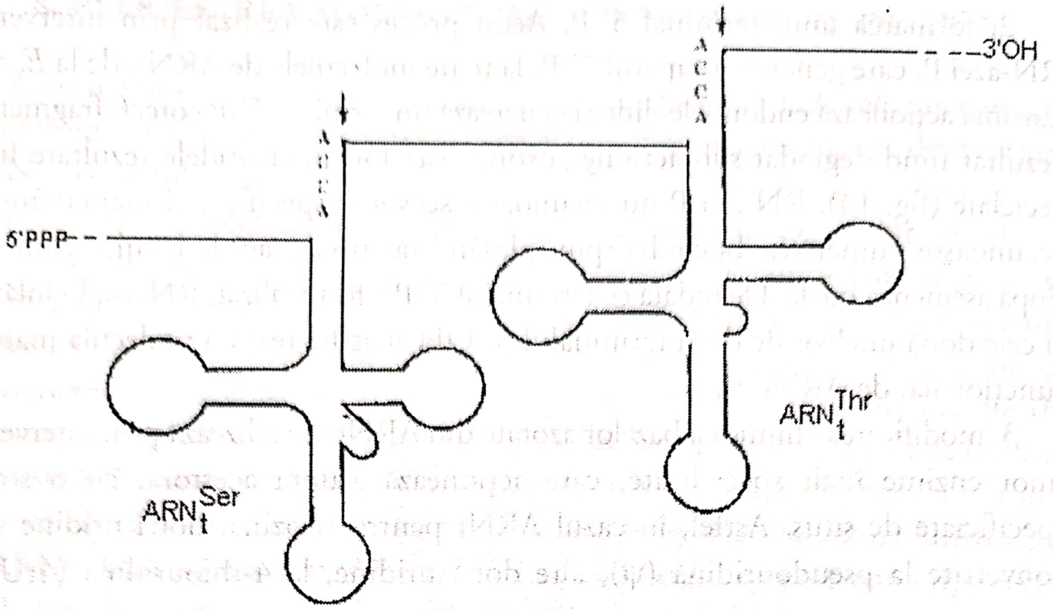

A
C
C
A
3'OH
A
C
C
A
5'PPP
ARN$_t^{Ser}$
ARN$_t^{Thr}$

Fig. 16 — Producerea ARNt^{Ser} și ARNt^{Thr}, dintr-un transcript unic al celor două gene de la *E. coli*. Se reprezintă porțiunea transcriptului care conține atât ARNt^{Ser} cât și ARNt^{Thr}. Săgețile indică situsurile de clivare a porțiunilor care vor fi eliminate (din Freifelder, 1986)

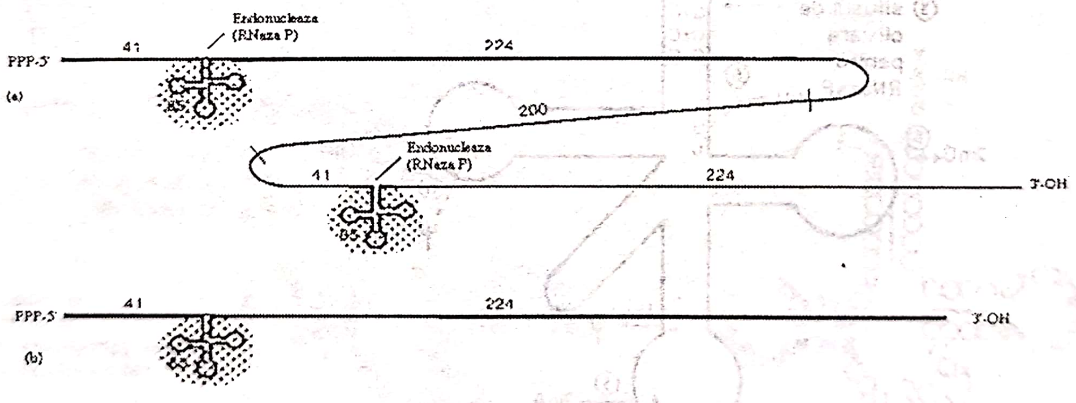

Endonucleaza
(RNaza P)
PPP-5'
(a)
41
224
85
200
Endonucleaza
(RNaza P)
41
224
3'-OH
85
PPP-5'
41
224
3'-OH
(b)

Fig. 17 — Transcriptul primar al genei pentru ARNt pentru tirozină de la *E. coli* și prelucrările sale posttranscripționale.
a) transcriptul primar, prezentând două segmente adiacente pentru ARNt^{Tyr} este sintetizat pe un segment corespunzător complementar al unei catene ADN, având un spațiator (*spacer*) de 200 nucleotide; b) redarea unei singure unități pentru ARNt pentru Tirozină care este supusă procesării. Numerele indică câte baze se află în fiecare segment al transcriptului. Secvențele pentru ARNt^{Tyr} sunt punctate (din Freifelder, 1986).

guanozină la 2'-O-metil-guanozină (2mG) și o adenozină la 2-isopenteniladenozină (2ipA) (fig. 15). Acestea sunt modificările principale, produse în diferitele molecule de ARNt, dar pe lângă ele pot apare și altele.

O situație interesantă este oferită de ARNt pentru serina și ARNt pentru treonina, la *E.coli* (fig. 16). Aceste molecule ARNt derivă dintr-un același transcript primar, în urma procesării sale, în cadrul prelucrărilor post-transcripționale.

În alte cazuri, într-un același transcript primar se află mai multe copii ale aceleiași molecule de ARNt. Aceasta este cazul ARNt pentru Leucină, la care molecula precursoare conține patru copii ale moleculei mature, funcționale.

Fagul T4 de *E.coli,* conține în ADN informația genetică pentru sinteza a opt molecule diferite de ARNt, fiecare existând sub forma a cel puțin două copii, și alte două molecule stabile de ARN, cu funcție necunoscută. Toate aceste molecule de ARN derivă prin clivare dintr-un transcript unic, gigantic, care conține mai mult de 1.000 de nucleotide.

În cazul genei pentru ARNt pentru tirozină, la bacteria *E. coli*, aceasta are două copii adiacente, așezate în tandem care sunt transcrise într-un transcript primar comun din care endonucleazele și exonucleazele modelează, decupează molecule singulare, mature, funcționale de ARNt^{Tyr} (fig. 17).

Cele 60 de gene pentru moleculele de ARN de transfer de la *E. coli* sunt grupate în 25 de unități care sunt transcrise în precursori multimerici. Unele unități codifică și ARNr, pe când altele conțin doar ARNt. Unul dintre transcriptele primare ARNt reprezintă precursorul a nu mai puțin de șapte tipuri distincte de ARNt, unul pentru leucină, două pentru metionine interne, și două pentru fiecare din cei doi codoni pentru glutamină (fig. 18). Transcriptul

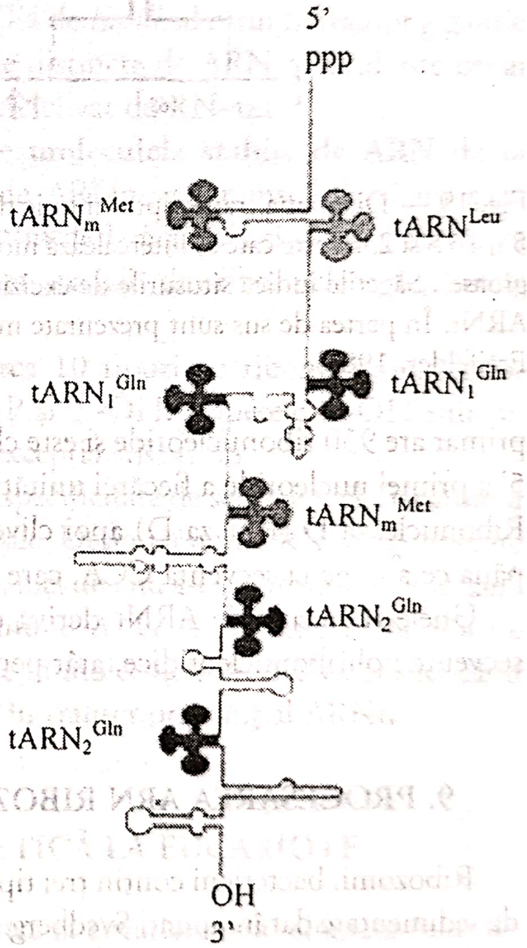


Fig. 18 — Șapte molecule de ARNt sunt formate prin clivarea unui transcript primar de 950 nucleotide (după Nakajima și colab., 1981.

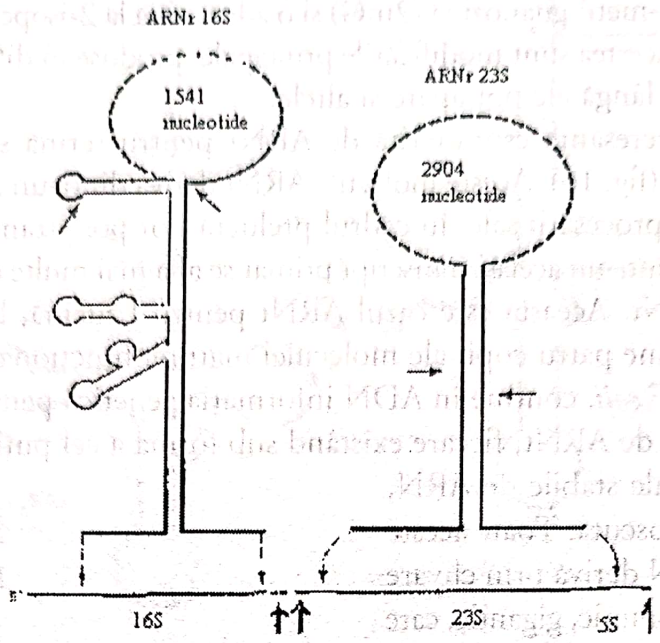


Fig. 19 — Diagrama transcriptului unic de la E. coli care cuprinde moleculele de ARNr 5S, 16 S și 23S între care se intercalează moleculele pentru diferite tipuri de ARNt (săgețile groase). Săgețile indică situsurile de excizie pentru eliberarea moleculelor individuale de ARNr. În partea de sus sunt prezentate moleculele expandate de ARNr 16S și 23S (din Freifelder, 1986).

primar are 950 ribonucleotide și este clivat de ribonucleaza P (RNaza P) la partea 5' a primei nucleotide a fiecărei unități ce va deveni ARNt matur corespunzător. Ribonucleaza D (RNaza D) apoi clivează capătul 3' expus al fiecărui precursor până ce ajunge la secvența CCA, care devine terminalul 3' al moleculei mature.

Unele molecule de ARNt derivă chiar din transcripte primare care conțin secvențe poliribonucleotidice, atât pentru ARNt cât și pentru ARNr (fig. 19).

9. PROCESAREA ARN RIBOZOMAL LA *ESCHERICHIA COLI*

Ribozomii bacterieni conțin trei tipuri de ARNr, desemnate după coeficientul de sedimentare dat în unități Svedberg:5S, 16S, 23S. ARNr 5S are, la toate speciile analizate, aceeași secvență, înalt conservată, de 120 ribonucleotide. ARNr 16S are 1.541, pe când ARNr 23S are 2.904 ribonucleotide. Aceste molecule de ARNr sunt conținute împreună cu câteva molecule de ARNt, într-un transcript unic, continuu, care are peste 5.000 ribonucleotide și a cărui secvență este aproape complet cunoscută.

Iată cum se prezintă un asemenea transcript primar ce conține deopotrivă ARNt și ARNr:

16S-ARNr - ARNt^{Ile} - ARNt^{Ala}- ARNr 23S - ARNr 5S - ARNt^{Asp}- ARNt^{Trp}

Nu s-a remarcat existența unui pattern particular pentru pozițiile relative ale moleculelor de ARNr și ARNt, în diferitele transcripte primare. Transcriptul primar este tăiat, de regulă, pe când el este sintetizat, sub acțiunea a numeroase enzime care acționează secvențial. Prima enzimă pare a fi RN-aza III, o ribonuclează care taie ARN dublu-catenar. RN-aza P acționează în jurul segmentelor ce reprezintă ARNt. Acest sistem de transcriere unică, cel puțin pentru cele trei tipuri de ARNr, asigură un raport constant de 1:1:1 între moleculele de ARNr 16S, 23S și 5S. La bacterii nu s-a evidențiat procesarea ARNm, dar la fagii acestora s-au descris două cazuri de procesare a ARNm: cel al fagului T4 de *E.coli,* al cărui transcript gigantic este clivat de RN-aza III în cinci molecule distincte de ARNm, altul este cel al fagului φ 80, al cărui transcript ARNm este clivat de RN-aza P.

În concluzie, se poate spune că **toate moleculele stabile de ARN de la procariote sunt procesate.** Moleculele de ARNm, sunt instabile și nu sunt procesate. Excepție fac moleculele de ARNm de la fagii T4 și φ 80. Procesarea transcriptelor primare implică, pe lângă excizii de ribonucleotide, unele modificări chimice ale bazelor azotate.

În mecanismele procesării intervin circa 10 tipuri de ribonucleaze. Endonucleazele generează totdeauna capete 5'-P și 3'-OH. Capetele 3'-OH sunt în general formate de către exonucleaze, cu excepția ARNr 5S.

Multe enzime de procesare nu prezintă specificitate de secvență, ci mai curând ele recunosc caracteristicile structurale globale. Deși mai multe RN-aze cunoscute realizează tăieturi cu specificitate de secvență, nici una nu este o enzimă de procesare. Modicarea chimică a bazelor azotate comune A, G, C, U este o modificare enzimatică care generează baze neobișnuite în moleculele de ARNt, atunci când aceste baze comune sunt deja încorporate în transcriptul inițial ARNt.

10. TRANSCRIEREA GENETICĂ LA EUCARIOTE

Aspectele de bază în transcrierea genetică la eucariote sunt similare celor de la bacterii. Există însă cinci diferențe remarcabile:

1. celulele eucariote conțin trei clase de ARN polimerază nucleară, responsabile pentru sinteza diferitelor clase de ARN celular (ARNm, ARNr, ARNt,etc);
2. multe molecule de ARNm au durată lungă de viață, fiind asociate cu proteine constituind complexe ribonucleoproteinice (RNP) denumite *informosomi*;

3. ambii terminali 5' și 3' sunt modificați și anume la terminalul 5' apare o structură numită **cap (căciulă** sau **bonetă)**, pe când la terminalul 3' apare o secvență lungă, de până la 200 nucleotide, de **acid poliadenilic-poli(A)**-;

4. molecula matură de ARNm, utilizată ca matriță pentru sinteza catenei polipeptidice, reprezintă de regulă doar aproximativ 1/10 din dimensiunea transcriptului primar;

5. toate moleculele de ARNm la eucariote sunt monocistronice.

În cursul procesării ARNm, secvențele interpuse, denumite introni, sunt excizate și fragmentele corespunzâd exonilor sunt reunite,(sudate,lipite),acest proces numindu-se **SPLINCING,** noțiune introdusă de F.H.C. Crick, în anul 1979, după ce s-a descoperit că gena eucariotă are o structură mozaicată.

Pentru inițierea sintezei catenei ARNm, proces care are loc la nivelul promotorului, este necesară o secvență de baze similară cutiei Pribnow de la *E.coli*, secvență care are 25-30 baze și se află în amonte de situsul start al transcrierii. Această secvență este TATAAATA și este cunoscută sub denumirea de **secvență TATA** sau **cutia lui Hognes.** Această secvență este flancată de două regiuni bogate în GC. O a doua secvență, importantă pentru inițiere, se află la nivelul bazelor de la 30 la 50, în amonte de cutia Hognes. La eucariote nu s-a pus în evidență intervenția vreunui factor de terminare, de tipul factorului *rho*, de la bacterii.

11. ARN POLIMERAZELE EUCARIOTE

Prima ARN polimerază eucariotă a fost izolată din celulele mamiferelor. S-au descris trei clase majore de ARN polimeraze eucariote desemnate I, II, III și ele se întâlnesc în nucleul celular, asigurând expresia genelor clasa I (gene ribozomale), a genelor clasa II(gene pentru catene polipeptidice) și a genelor clasa III (pentru ARNt și ARNr 5S). ARN polimeraze minore se întâlnesc în mitocondrii și în cloroplaste. ARN polimeraza nucleară I este localizată în nucleol și este responsabilă de sinteza ARNr. ARN polimeraza II se află în nucleoplasmă și este responsabilă pentru transcrierea tuturor genelor structurale, adică pentru sinteza tuturor moleculelor de ARNm. Ea are o GM= 500.000 daltoni și constă din două subunități mari și 4-8 subunități mici. ARN polimeraza III se află în nucleoplasmă și este responsabilă pentru sinteza ARNt și ARN 5S.

11. CĂPĂCIREA (*CAPPING*) SAU BONETAREA CAPĂTULUI 5' AL ARNm ȘI *POLIADENILAREA* TERMINALULUI SĂU 3'

La eucariote, trecerea ARNm din nucleu în citoplasmă prilejuiește interacția acestuia cu numeroși factori destabilizatori, incluzând enzime hidrolitice de tip RN-ază. Din această cauză, capetele moleculei ARNm trebuie să prezinte o mare integralitate și stabilitate și, precum telomerele cromozomilor eucariotici conferă stabilitate capetelor acestor cromozomi, tot astfel, moleculele de ARNm prezintă la capete structuri specifice, care le conferă integralitate și stabilitate. Astfel, cu excepția ARNm specific Picornavirusurilor, toate speciile de ARNm celular și viral, sintetizate în celula eucariotă, posedă la capătul 5'-P o structură moleculară specială, ca un *capac*, numită *căciulă* sau *bonetă* și care este asociată cu o proteină specifică acestei structuri. Structura bonetată a ARNm interacționează în mod specific cu factorii de inițiere ai translației. Căpăcirea terminalului 5' al moleculelor precursoare de ARNm apare la terminalul 5' al transcriptelor sintetizate sub direcția ARN polimerazei II, aproape imediat după inițierea transcrierii. De fapt, căpăcirea este o reacție chimică catalizată de enzima **guanozină 7 metiltransferaza**, având ca substrat GTP, pe de o parte, și capătul difosfat creat prin înlăturarea fosfatului terminal din trifosfatul primului nucleotid, inclus în ARN *in statu nascendi*, pe de altă parte. Acest fosfat terminal este înlocuit cu grupul guanilil al GTP, prin pierderea și din acest GTP a două grupări fosfat terminale și atașarea acestui rest guanilil la capătul 5' al ARNm aflat în curs de sinteză. Dacă la terminalul 5' al ARNm precursor se află un monofosfat, o asemenea reacție nu mai poate avea loc.

Boneta sau căciula care rezultă în urma unei asemenea reacții este reprezentată de un rest Guanină, adăugată posttranscripțional și care este metilată în poziția 7 a inelului purinic, cu ajutorul enzimei guanozină 7 metiltransferază.

Gruparea 2'- OH din primul și cel de-al doilea nucleotid din ARNm nascent este ulterior metilată de către o altă enzimă numită **2'-O-metiltransferaza.** Aceste activități enzimatice din cadrul procesului de căpăcire sunt asociate sistemului polimerazic.

Căpăcirea are rol de protecție a capătului 5' față de degradarea exonucleazică și de atașare a ribozomilor la ARNm, în procesul de inițiere a traducerii. Căciulile" sau „bonetele" ("*caps*") și „cozile" ("*tails*") moleculelor de ARNm eucariot prezintă particularități interesante. Terminalul 5' al moleculei de ARNm eucariot este blocat de formarea unei legături 5'-5' pirofosfatice a unei Guanozine metilate numită 7-metilguanozina (7-MeG), fie la 2'-0-metilguanozina (2'-0MeG) (acoperiș 1), fie la următoarea 2'-0-metiladenozina (2'-0MeA) (acoperiș 2) (fig. 20)

Această unitate structurală:

(7-MeG) — 5' — PPP — 5' — [2' — 0Me(G/A)] — 3' — P — 5'

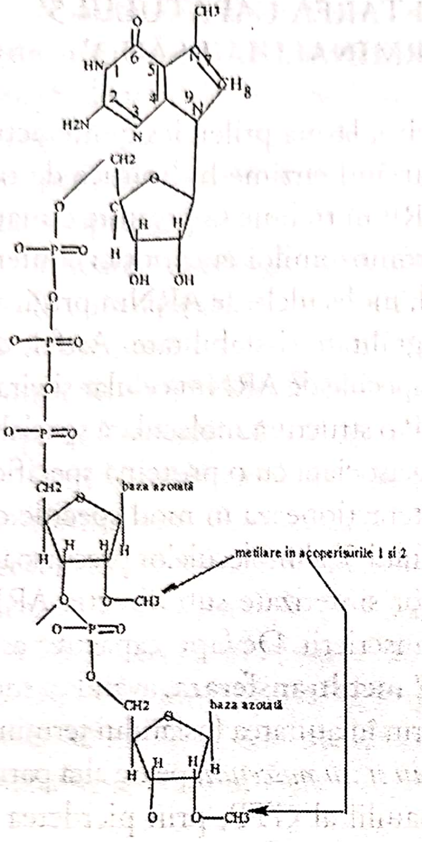


Fig. 20 — Situsurile (acoperișurile) la nivelul cărora are loc procesul de căpăcire (**bonetare**) a ARNm (după Freifelder,1986)

- nucleozid — 3'P, în care P este monofosfatul, iar PPP este trifosfatul, nu are un terminal 5' liber, din care cauză se spune că este „acoperit", bonetat, cu căciulă sau „*capped*". Metilarea poate avea loc și la riboză, la poziția 2'. Există trei tipuri de „acoperire" desemnate 0, 1, 2 și se pare că fiecare moleculă de ARNm are o structură de acoperire specifică, la terminalul 5'. În cazul 0 nu are loc metilarea ribozei, ci numai a guaninei terminale. În cazul 1, este metilată o riboză, iar în cazul 2 sunt metilate două riboze(fig. 21).

Această acoperire a terminalului 5' cu un rest guanozil metilat apare la scurt timp după inițierea sintezei ARNm, posibil înainte ca ARN polimeraza II să părăsească situsul de inițiere, precedând toate evenimentele de excizie și sudare. Acest proces reprezintă un mecanism de protecție față de degradarea nucleazică la care ar putea fi expus ARNm și totodată el constituie un semnal recunoscut de către mașinăria moleculară de sinteză proteinică- ribozomul.

La terminalul 3', cele mai multe molecule de ARNm de la animale prezintă o prelungire sau o coadă poli (A), care este adăugată la ARNm precursor, sub acțiunea unei enzime nucleare numită poli (A)-polimeraza. Resturile adenilat nu sunt adăugate la terminalul 3' al transcriptului primar, deoarece transcripția trece, în mod normal, de situsul de adiție a poli (A), astfel că trebuie să intervină un clivaj endonucleolitic, înainte de a fi adăugat poli (A).O secvență de baze –AAUAAA-aflată între a 10-a și a 25-a bază, în amonte de situsul de poliadenilare, se constituie într-un component al sistemului de recunoaștere a situsului pentru adiția lui poli (A). Unele transcripte primare conțin două sau mai multe situsuri, în care poate fi adăugat poli (A).

Lungimea segmentului poli (A) poate fi între 20 și 200 nucleotide. Se crede că acest poli (A) mărește stabilitatea ARNm și că ajută ARNm să se atașeze la membranele intracelulare. Unele molecule de ARNm celular nu au acest poli (A), astfel că s-a dedus că această componentă nu este obligatorie pentru reușita

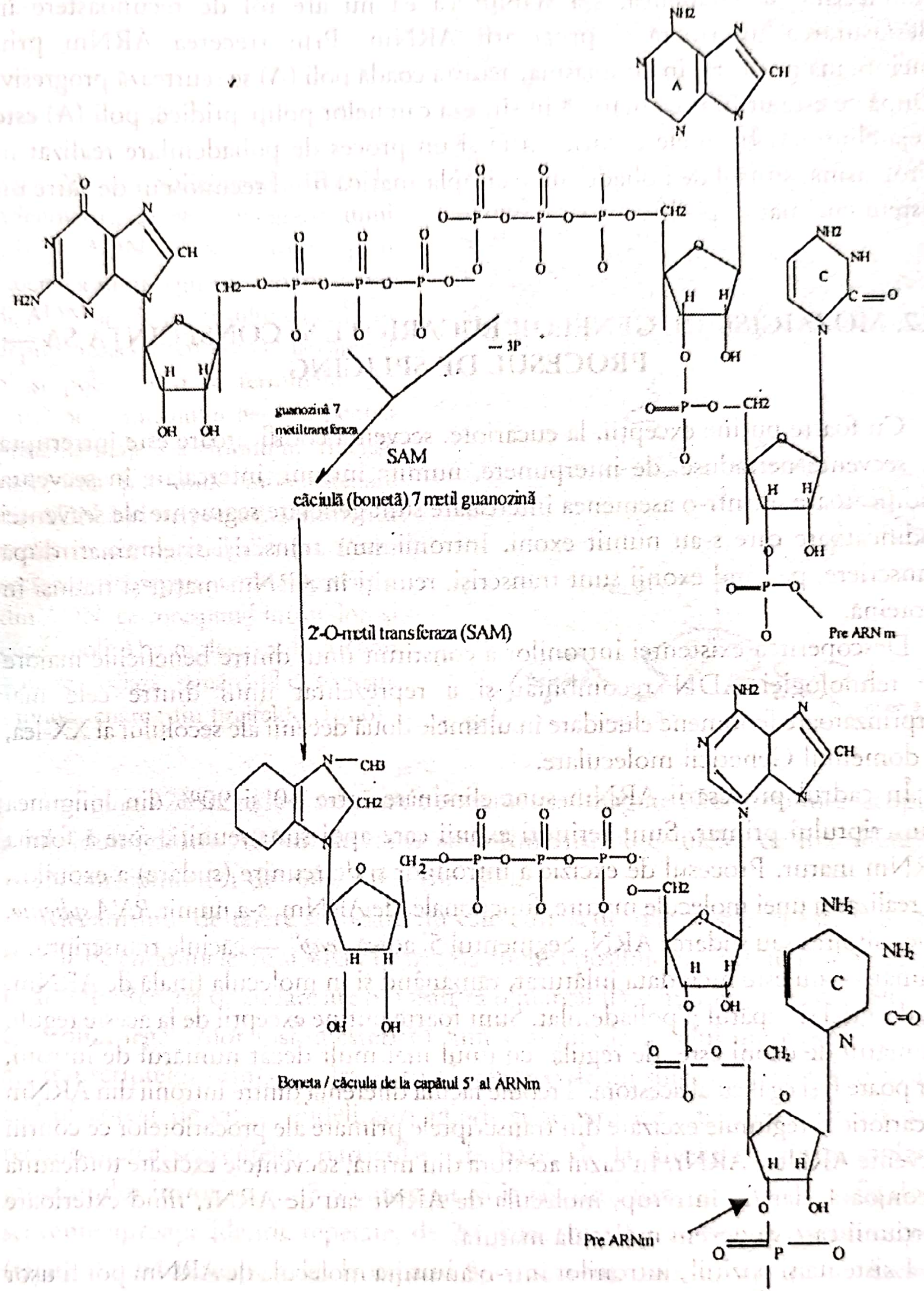

NH2
N
CH
A
N
O
N
CH
N
H2N
N
CH2
O
P
OH
H
— 3P
guanozină 7 metiltransferaza
SAM
căciulă (bonetă) 7 metil guanozină
2'-O-metil transferaza (SAM)
NH2
NH
C
C=O
Pre ARN m
N—CH3
CH2
NH2
C
N
Boneta / căciula de la capătul 5' al ARNm
Pre ARNm

Fig. 21 — Enzimologia reacției de bonetare a ARNm (după Freifelder, 1986)

traducerii. De asemenea, s-a stabilit că ea nu are rol de recunoaștere în desfășurarea ulterioară a procesării ARNm. Prin trecerea ARNm prin membrana nucleară, în citoplasmă, această coadă poli (A) se scurtează progresiv. După ce este utilizat ca matriță în sinteza catenelor polipeptidice, poli (A) este deja eliminat. În unele cazuri, există și un proces de poliadenilare realizat în citoplasmă, situsul de poliadenilare citoplasmatică fiind recunoscut de către un sistem enzimatic specific.

12. MOZAICISMUL GENELOR EUCARIOTE ȘI CONSECINȚA SA — PROCESUL DE SPLICING

Cu foarte puține excepții, la eucariote, secvența codificatoare este întreruptă de secvențe netraduse, de interpunere, numite introni, intercalate în secvența codificatoare. Printr-o asemenea intercalare sunt generate segmente ale secvenței codificatoare care s-au numit exoni. Intronii sunt transcriși și eliminați după transcriere, pe când exonii sunt transcriși, reuniți în ARNm matur și traduși în proteină.

Descoperirea existenței intronilor a constituit unul dintre beneficiile majore ale tehnologiei ADN recombinat și a reprezentat unul dintre cele mai surprinzătoare fenomene elucidate în ultimele două decenii ale secolului al XX-lea, în domeniul Geneticii moleculare.

În cadrul procesării ARNm sunt eliminate între 50 și 90% din lungimea transcriptului primar. Sunt reținuți exonii care apoi sunt reuniți, spre a forma ARNm matur. Procesul de excizie a intronilor și de reunire (sudare) a exonilor, cu realizarea unei molecule mature, funcționale, de ARNm, s-a numit *RNA splicing*, adică altoirea sau sudarea ARN. Segmentul 5' adică „*cap*" — căciula transcriptului primar — nu este niciodată înlăturat, rămânând și în molecula finală de ARNm, ca, de altfel și capătul 3'poliadenilat. Sunt foarte puține excepții de la aceste reguli. Numărul de exoni este, de regulă, cu unul mai mult decât numărul de introni, dar poate fi și egal cu al acestora. Trebuie făcută diferența dintre intronii din ARNm eucariotic și regiunile excizate din transcriptele primare ale procariotelor ce conțin secvențe ARNt și ARNr. În cazul acestora din urmă, secvențele excizate totdeauna înconjoară, dar nu întrerup, molecula de ARNt sau de ARNr, fiind exterioare porțiunii care va deveni moleculă matură.

Existența și pozițiile intronilor într-o anumită moleculă de ARNm pot fi ușor demonstrate prin examinarea la microscopul electronic a hibridului ADN-ARN realizat între catena de ADN genomic, care a fost transcrisă, și molecula de ARNm deplin procesată.

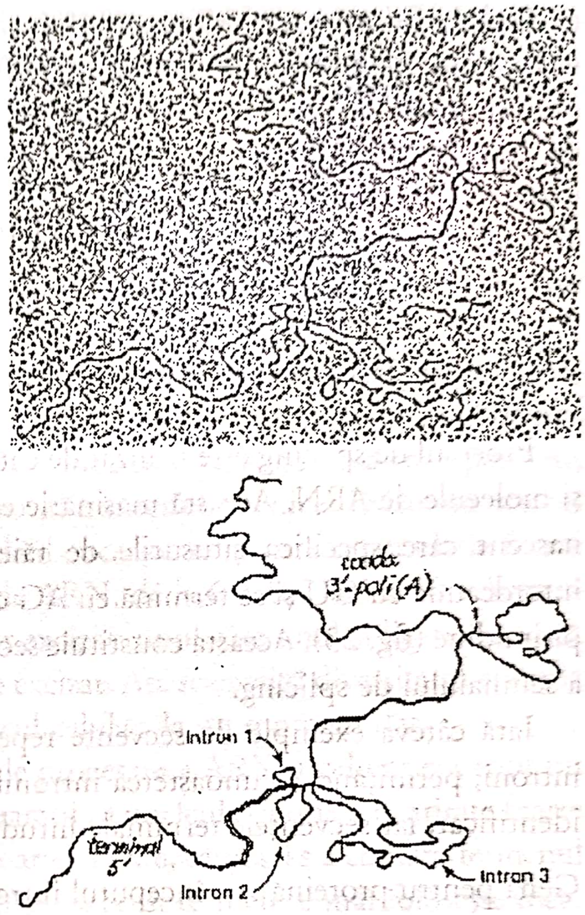


Fig. 22 — Splicing-ul ARN la Adenovirus; a) electronografia unui hibrid ADN–ARN obținut prin asocierea unui segment monocatenar de ADN al adenovirusului cu ARNm deplin procesat (cu bonetă la capătul 5' și poliadenilat la terminalul 3') purtător al mesajului genetic pentru proteina majoră a virionului. Buclele reprezintă porțiunile monocatenare din ADN. b) interpretarea schematică a electronofotografiei din (a). Patru sectoare–trei segmente monocatenare din ADN, ce corespund intronilor, și coada poli(A) a moleculei de ARNm – nu se asociază, rămânând ca sectoare monocatenare (din Freifelder, 1986)

În figura 22 este redată schematic o asemenea imagine electronomicroscopică a hibridului dintre ARNm de *Adenovirus* (un virus al celulelor de mamifere) și ADN corespunzător de *Adenovirus* (fig. 22).

Mecanismul de tăiere și sudare nu este cunoscut, dar se știe că este cerută o baterie de endonucleaze și ARN ligaze. Asemenea posibile enzime au fost detectate la drojdii. Reacția de sudare are o trăsătură remarcabilă și anume aceea că tăieturile (hidroliza legăturilor fosfodiesterice) sunt realizate la nivelul unor poziții unice ale transcriptelor primare. Orice eroare, chiar și de un singur nucleotid, distruge cadrul corect de citire. Fidelitatea tăierii și sudării este asigurată numai prin recunoașterea secvențelor particulare de baze, de la nivelul și din apropierea joncțiunilor intron-exon. S-a constatat că la sfârșitul fiecărui intron se află două secvențe aproape identic repetate, de 2-6 baze, care fac ca fiecare intron excizat (tăiat) să aibă secvența GU, la capătul 5', și secvența AG, la capătul 3'. Aceasta este așa numita **„regulă a lui Chambon"** și asemenea secvențe au fost identificate la sisteme foarte diferite (găină, șoarece, iepure, virusul animal SV_{40}). Regula lui Chambon arată că secvența de baze a unui intron începe cu GU și se termină cu AG.

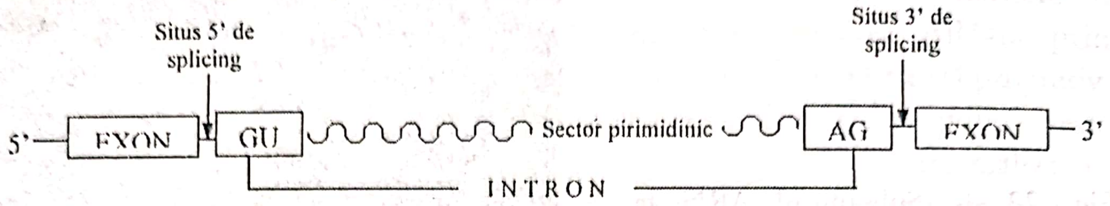


Fig. 23 — Secvența consens pentru splicing-ul unui precursor ARN.

Procesul de splicing este realizat de către *spliceosomi* – ansambluri de proteine și molecule de ARN. Această mașinărie enzimatică recunoaște semnale în ARN nascent care specifică situsurile de tăiere și sudare. Intronii încep aproape întotdeauna cu GU și se termină cu AG care este precedat de un sector bogat în pirimidine (fig. 23). Aceasta constituie secvența consens care este parte integrantă a semnalului de splicing.

Iată câteva exemple de secvențe repetate din apropierea terminalilor unor introni, permițând recunoașterea intronilor (secvențele GU și AG sunt ușor de identificat, iar secvențele terminale înrudite sunt redate în scriere **bold**):

Gena pentru proteină	începutul intronului	sfârșitul intronului
	3’ 5’	3’ 5’
β - globina, intron 1	---------- G **CAGGUU** G	------ U **CAGGCU** G -----
β - globina, intron 2	---------- **CAG** G GUGA	------ A **CAG** UCGC -----
Ig , intron 1	---------- U **CAGG** UCA	------ G **CAGG** GGC -----
Antigen T timpuriu SV_{40}	---------- **UAAG** GUAA	------ **UUAG** AUUC ------
Ovalbumina intron 2	---------- UA **AGGU** GA	------ AC **AGGU** UG -----
Ovalbumina intron 3	---------- **UCAG** GUAC	------ **UCAG** UCUG ------
Ovalbumina intron 4	---------- GC **CAGUA** A	------ A **CAGGA** GA -----
Ovalbumina intron 5	---------- **AAUGGUAA**	------ **AAAGGAAA** ------
Ovalbumina intron 6	---------- UG **AGGUA** U	------ CC **AG** CAAG -----
Ovalbumina intron 7	---------- **GCAGGU** AU	------ **GCAGCU** UG ------

Trebuie să fie și alte semnale de recunoaștere a joncțiunilor introni-exoni care se anticipează a fi descoperite. S-a admis că există și foarte mici molecule de ARN care se asociază complementar cu secvențele distale de baze din transcriptul primar, spre a aduce în contact exonii, în timpul evenimentelor de tăiere și sudare.

Molecule de acest fel au fost recent identificate, dar nu este încă clar dacă ele funcționează în acord cu ipoteza de mai sus.

Numărul de introni per moleculă de ARNm variază considerabil, de la 2, în gena și respectiv transcriptul primar ARNm pentru α - globină și catena L a imunoglobulinei, la 4, în catena H a imunoglobulinei, 6, pentru citocromul b, din mitocondriile de drojdie de bere și pentru ovomucoidă, 7, pentru ovalbumină, 16, pentru ovotransferină, 17, pentru conalbumină și 52, pentru α-colagen. Până în prezent, genele pentru α - interferon, pentru β-interferon și pentru histone sunt singurele gene structurale cunoscute a fi transcrise și traduse și care nu au structură mozaicată, adică nu conțin introni.

Intronii au o distribuție diferită în transcriptul primar, au lungimi diferite, dar există o regulă și anume intronii sunt invariabil mai lungi decât exonii. Sudarea are loc în nucleu, după ce s-a realizat bonetarea și după adăugarea cozii poli (A), la ARNm precursor — produsul primar al transcrierii genice. Existența acestui proces de splicing explică de ce în nucleul eucariot se găsește o populație foarte heterogenă dimensional, de molecule de ARN, de la 6×10^4 la 3×10^6. Aceasta este consecința faptului că intronii sunt excizați unul câte unul și ligația exonică are loc înainte ca următorul intron să fie excizat. Așa se explică diversitatea enormă de molecule de ARN existente în nucleul celular, la un moment dat.

Înainte de a fi înțeles mecanismul de procesare a ARNm celular eucariot nu se putea da o explicație pertinentă constatării că nucleul conține o cantitate foarte mare de molecule de ARN, de lungimi foarte diferite, cărora li s-a conferit termenul generic de *ARN nuclear heterogen (hnRNA)* și acest termen se mai folosește încă. Dacă înainte, acestea erau considerate ca ARN posibil inutil, acum se știe că asemenea molecule reprezintă intermediari aflați în diferite etape ale procesării prin splicing. După ce procesarea este completă, ARNm matur este transportat în citoplasmă, unde este supus translației.

Nu se știe de ce transcriptele primare și moleculele doar parțial procesate nu sunt transferate din nucleu în citoplasmă.

Nu este cunoscută nici semnificația *splicing*-ului, de vreme ce s-ar părea a fi mai ușor să se sintetizeze molecule de ARNm direct funcționale în traducerea genetică, fără a se mai interpune *splicing*-ul. S-au enunțat multe ipoteze și teorii despre acest fenomen, dar numai la foarte puține organisme s-a stabilit că el servește unei finalități evidente.

De exemplu, virusul SV_{40}, al cărui genom — molecula de ADN viral SV40 — este atât de mic, încât ar putea conține doar foarte puține gene – utilizează una din moleculele sale ARNm de două ori, odată înainte de clivare și apoi, încă o dată, dar numai după ce a eliminat din el un anumit număr de nucleotide. Pe această cale, într-un același segment de ARN este transcris mesajul genetic pentru două proteine diferite. Acest tip de economie a fost observată la virusurile mici ale unor specii animale. Până în prezent, Parvovirusurile reprezintă singurul grup de virusuri animale cu ADN monocatenar linear, constând din 4.800 baze care, asemănător fagului φx174, de la bacteria *Escherichia coli,* prezintă gene suprapuse. La aceste virusuri, fără splicing, datorită cantității reduse de material genetic, ar fi imposibil să se asigure întreaga informație ereditară necesară îndeplinirii funcțiilor lor.

În producerea ARNm al Adenovirusului se realizează un alt tip de splicing. Adenovirusurile au o greutate moleculară a ADN de 23 — $30x10^6$ și codifică pentru cel puțin 20 proteine. În acest caz, există cel puțin cinci unități de transcriere timpurie, fiecare inițiind transcrierea la un promotor unic. Cele cinci unități de transcriere nu sunt activate simultan, ci în decurs de trei ore, unele fiind negativ reglate de înseși produșii lor genici. În final, fiecare ARNm timpuriu este supus splicing-ului, înainte de a fi tradus. De fapt, splicing-ul ca proces, a fost pentru prima dată descoperit prin studii asupra Adenovirusului. Modelul de formare a ARNm tardiv este încă și mai complex. Sinteza ARNm tardiv cere ca mai întâi să înceapă replicarea ADN viral. Dar, nu replicarea în sine este cerută în acest caz, ci doar debutul procesului de replicare, ceea ce este diferit de cazul fagului T_4, al bacteriei *E.coli.* Acest ARNm viral tardiv este excesiv procesat și din el derivă numeroase molecule diferite de ARNm, fiind un exemplu tipic de maximalizare a conținutului informațional al unui aceluiași segment de ADN. În acest caz, funcționează un singur promotor tardiv și un singur semnal stop. Dar, ARNm sintetizat este tăiat la nivelul a 4 situsuri diferite și la fiecare se adaugă o coadă poli-(A). Cele cinci segmente ARNm rezultate reprezintă fiecare în parte un alt mesager, având câte un codon AUG inițiator al translației. Dar, fiecare segment conține mai mulți introni adiacenți și au loc mai multe operații de excizie și sudare, generându-se astfel mai multe molecule distincte de ARNm viral matur. Pe această cale, pot fi sintetizate cele peste 14 proteine tardive virale, sub controlul aceluiași promotor. Deoarece probabilitatea evenimentelor de tăiere-sudare și de adăugare a cozii poli-(A) nu este aceeași, rezultă concentrații diferite ale acestor proteine. Acesta este un tip de control translațional comun sistemelor eucariote și inexistent la cele procariote, la acestea din urmă, probabilitatea de traducere a diferiților cistroni dintr-un ARNm policistronic fiind determinată de fermitatea legării situsurilor de legare la ribozomi și proximitatea unui codon start față de codonul stop precedent.

Stilul de viață al virusurilor mimează pe acela al celulei gazdă. Totuși, utilizarea splicing-ului spre a crește capacitatea de codificare nu oferă o explicație adecvată ubicvității sale în celulele animale, de vreme ce, în cele mai multe cazuri, celulele eucariote au mai mult decât suficient ADN.

Utilizarea aceluiași segment de ADN pentru a înscrie în el informația ereditară pentru mai multe gene, precum și utilizarea aceleiași molecule de ARNm supusă așa numitului splicing alternativ, în cadrul căruia funcționează mai multe puncte de inițiere a clivării intronilor și exciziei lor, asociată cu sudarea exonilor, rezultând mai mulți mesageri din aceeași moleculă de ARNm precursor (ce poartă mesajul genetic pentru catene polipeptidice diferite) se înscrie într-un principiu esențial al vieții și anume *principiul economiei.* Puține tipuri de molecule de ARNm nu sunt supuse splicing-ului. Un exemplu este cel al transcriptului genei ce codifică pentru α-interferon. La cealaltă extremă se situează ARNm-urile ce transcriu genele pentru diferitele tipuri de colagen, care au zeci sau sute de introni.

Sunt și autori care au emis ipoteza implicării unui tip particular de ARN numit ARN de unire („*joiner*“) în procesul de splicing. (fig. 24)

Aceste molecule mici de ARN ar avea proprietatea de a se asocia temporal cu sectorul de joncțiune intron-exon și de a marca astfel situsul de clivaj endonucleazic, urmat de excizia intronului, sudarea exonilor prin punte fosfodiesterică, după care acest ARN „*joiner*“ s-ar disocia.

Se cunoaște și cazul paradoxal în care în celula eucariotă informația pentru sinteza proteinică este codificată într-un intron. Este cazul genei pentru citocromul b, de la drojdia de bere. La această genă, splicing-ul începe prin excizia primului intron care capătă formă circulară. Aceasta înseamnă că nu numai capetele exonilor pot fi sudate, dar și cele ale intronului pot fi reunite. După excizia acestui intron 1,

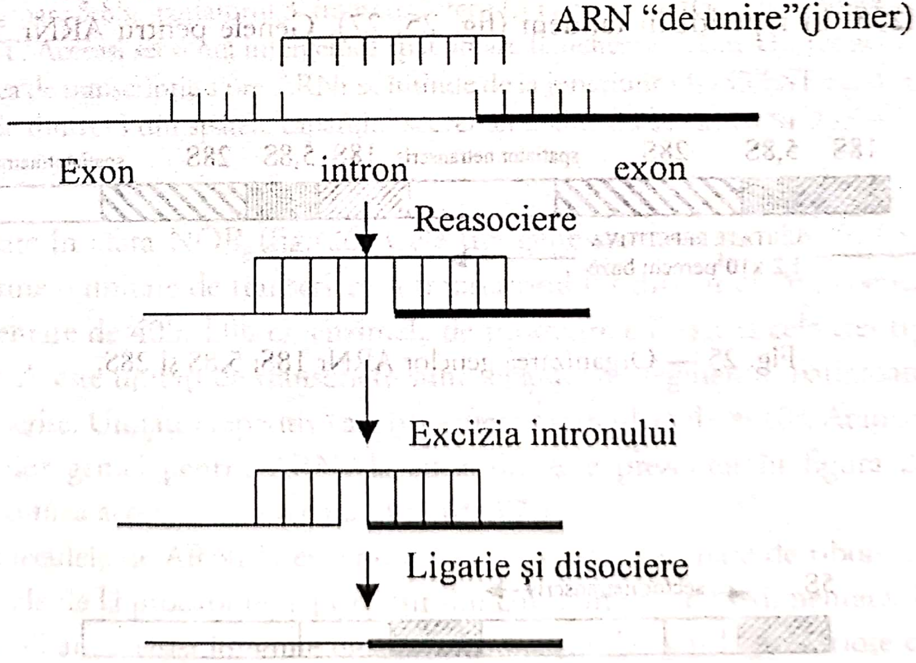


Fig. 24 — ARN „de unire“ (joiner).

exonii care mai înainte erau separați de interpunerea intronului, devin adiacenți și împreună cu următorul intron (intronul 2) constituie o unitate de codificare care este tradusă ca atare. Produsul de traducere a acestei unități este o proteină. Această proteină este cerută de excizia intronului 2. Acest tip de mecanism sugerează că splicing-ul poate uneori îndeplini un rol fundamental în reglarea expresiei genice în celulele animale, apoi în angajarea unei celule a sistemului imunitar, în producerea unui tip particular de anticorp, etc.

Totodată, s-a dovedit că diferențierea celulară este asociată cu capacitatea de a procesa anumite clase de transcripte. Experiențe de transfer de gene prin tehnologia ADN recombinat au dovedit că numai gena normală (cu introni și exoni) poate dirija în celula în care a fost clonată sinteza produsului specific. Gena construită în vitro, prin reverstranscriere, utilizând ca matriță ARNm matur pentru β-globină, din care fuseseră excizați intronii, nu a dirijat sinteza produsului specific.

14. GENELE RIBOZOMALE ȘI ARNR LA EUCARIOTE

Ribozomii eucariotelor conțin 4 tipuri de ARNr: 5S, 5, 8S, 18S, 28S (25S, la plante). Genele pentru ARNr 5,8S; 18S și 28S sunt localizate în regiunea organizator nucleolară (NOR), din cromozomul organizator al nucleolului, constituind cistronii ribozomali (ADNr), fiind așezate în ordinea 18S– 5,8S — 28S / 25S, în repetiții în tandem (fig. 25, 27). Genele pentru ARNr 5S sunt

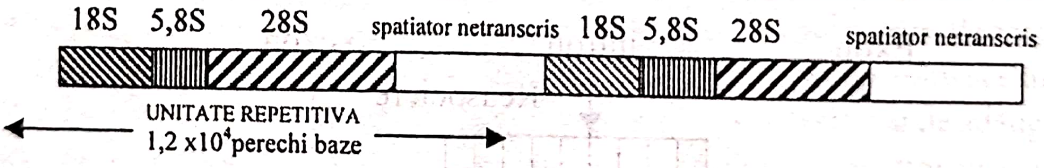


Fig. 25 — Organizarea genelor ARNr 18S; 5,8S și 28S.

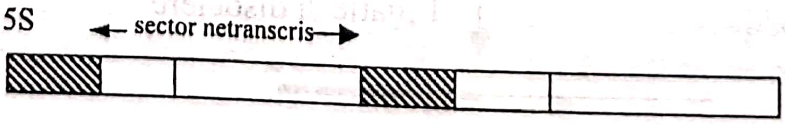


Fig. 26 — Organizarea genelor ribozomalepentru ARNr 5S.

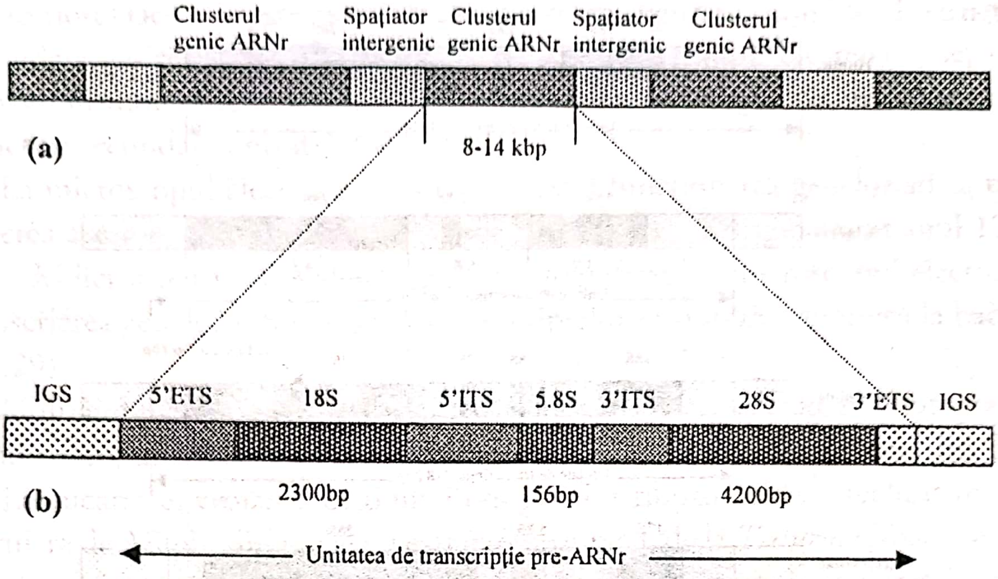

Clusterul genic ARNr
Spațiator intergenic
Clusterul genic ARNr
Spațiator intergenic
Clusterul genic ARNr
(a)
8-14 kbp
IGS
5'ETS
18S
5'ITS
5.8S
3'ITS
28S
3'ETS
IGS
(b)
2300bp
156bp
4200bp
Unitatea de transcripție pre-ARNr

Fig. 27 — Aranjamentul clusterilor genelor ARNr la eucariote; a) fiecare cluster genic ARNr are între 8 și 14 Kpb lungime, depinzând de specie și este separat față de un alt cluster genic printr-un spațiator intergenic (IGS) care este înalt variabil ca lungime la diferite specii, dar relativ constant ca lungime, în cadrul aceleiași specii. b) fiecare cluster genic ARNr constituie o singură unitate de transcripție alcătuită din spațiatorul transcris extern (5'EST), secvența codificatoare ARNr 18 S, spațiatorul intern transcris (ITS), secvența codificatoare 5,8S, spațiatorul 3' transcris intern (3'ITS), secvența codificatoare ARN 28S și 3'EST. Aceeași secvență intergenică spațiatoare flanchează fiecare cluster genic ARNr. Unitatea de transcripție a pre-ARNr se întinde de la joncțiunea IGS5'EST până la situsuri variabile din IGS din spatele capătului secvenței codificatoare a ARNr 28S (din Singer și Berg, 1991).

localizate în afara NOR (fig. 26) Cele trei gene ribozomale 18S; 5, 8S și 28S constituie o unitate de transcriere și transcriptul lor primar are un coeficient de sedimentare de 40S. Din el, enzimele de procesare eliberează cele trei tipuri de ARNr. Aceste unități de transcriere sunt separate de segmente spațiatoare mari, netranscrise. Unitatea repetitivă are o greutate moleculară de 8×10^6. Aranjamentul clusterilor genici pentru ARNr la eucariote este prezentat în figura 27a, iar dimensiunea acestora este redată în figura 27b.

Moleculele de ARNr la eucariote au o secvență mai mare de ribonucleotide decât cele de la procariote, fapt reieșit din constanta lor de sedimentare. Numai ARNr 5S are aceeași lungime de 120 ribonucleotide, atât la procariote cât și la eucariote, prezentând un remarcabil conservatorism de secvență, în lumea vie. Lungimea mare a moleculelor de ARNr (16S și 23S la procariote, 18S și 28/25S

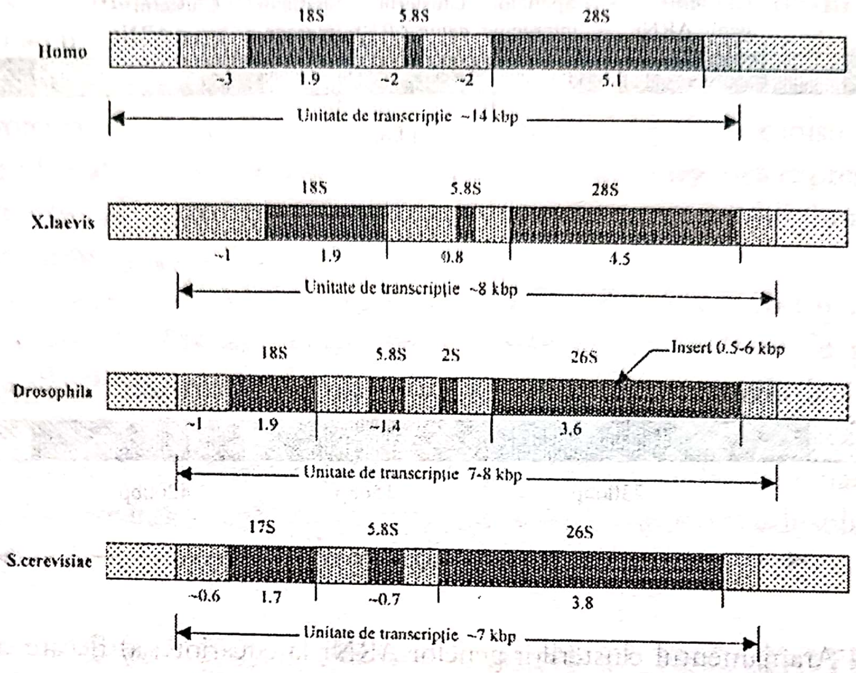

Homo
18S
5.8S
28S
~3
1.9
~2
~2
5.1
Unitate de transcripție ~14 kbp
X.laevis
18S
5.8S
28S
~1
1.9
0.8
4.5
Unitate de transcripție ~8 kbp
Drosophila
18S
5.8S
2S
26S
Insert 0.5-6 kbp
~1
1.9
~1.4
3.6
Unitate de transcripție 7-8 kbp
S.cerevisiae
17S
5.8S
26S
~0.6
1.7
~0.7
3.8
Unitate de transcripție ~7 kbp

Fig. 28 — Aranjamentele și dimensiunile segmentelor din diferiții clusteri genici ARNr. Numerele de dedesubtul fiecărui segment reprezintă lungimile aproximative, în perechi de kilobaze. Unele secvențe codificatoare pentru molecula mare de ARNr, la *Drosophila*, conțin un insert de 0,5–6Kbp care nu mai apare în ARNr matur de 26S, din care cauză, aceasta are o constantă de sedimentare mai mică (după Singer și Berg, 1991).

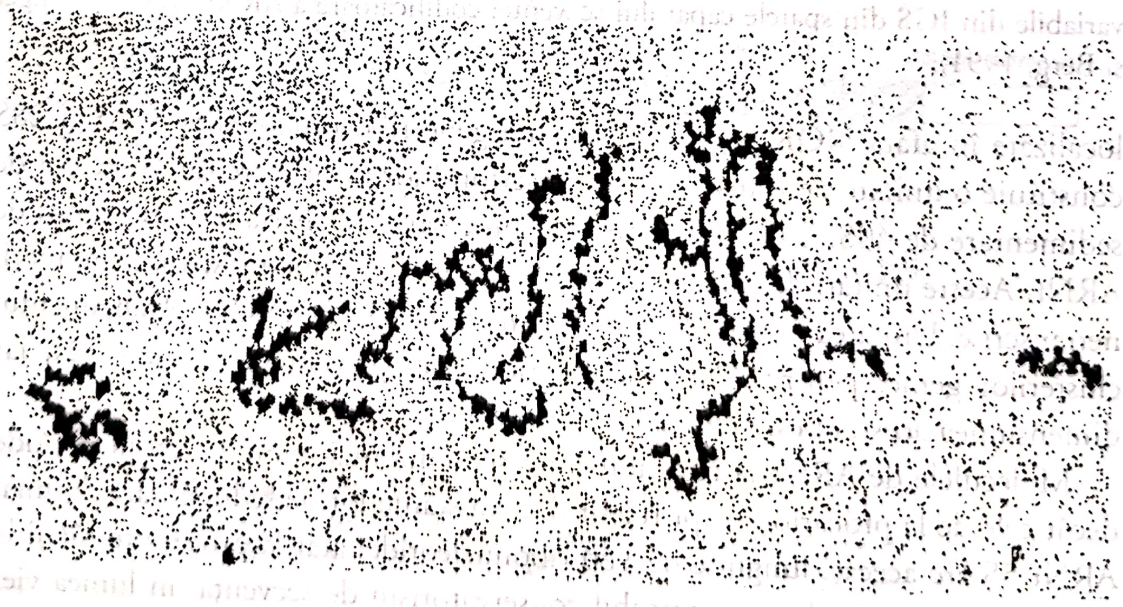


Fig. 29 — Transcripția ARNm la *E. coli* (după O. Miller, 1970).

la eucariote) face ca aceste molecule să prezinte configurații complexe de structură secundară, cu realizarea de multiple și neuniforme regiuni bicatenare, separate de regiuni monocatenare, încât, s-a propus pentru configurația unor asemenea structuri secundare **„modelul floral“**.

La microscopul electronic a fost vizualizată funcționarea genelor adică transcrierea acestora. Prin punerea la punct a unor metode originale, în anul 1969, O.L. Miller a reușit să evidențieze și să fotografieze, la microscopul electronic, transcrierea genelor și funcționarea transcriptelor în sinteza proteinică la bacterii (fig.29).

Utilizând metode adecvate, același autor a reușit să vizualizeze și să fotografieze la microscopul electronic transcrierea genelor ribozomale la eucariote (fig. 30).

La eucariote, vizualizarea transcrierii genelor ribozomale s-a realizat în axele circulare de ADNr, din nucleolii extracromozomali, de la *Triturus (Notophtalmus) viridescens.* Acești nucleoli extracromozomali sunt produși ai amplificării genice ribozomale. Copii extrareplicate ale cistronilor ribozomali se desprind ca *„sclave“* (*slaves*) din gena *„stăpână“* (*master*), rămasă în situsul său normal din regiunea organizator nucleolară a cromozomului organizator nucleolar și este replicată de nenumărate ori, după modelul inelului rotativ, dând numeroase alte copii de cistroni ribozomali. Aceștia sunt transcriși în ARNr. La microscopul electronic au fost evidențiate zonele active în transcriere, prezentând un gradient de lungime

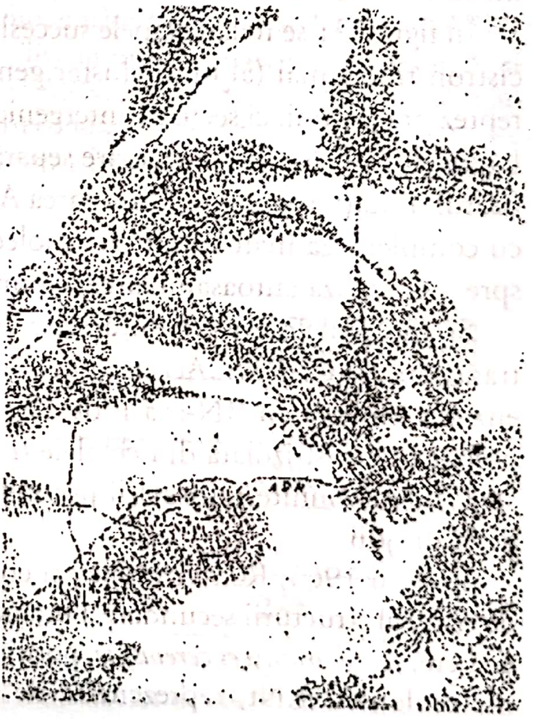


Fig. 30 — Transcrierea genelor pentru ARNr la nivelul nucleolilor extracromozomali din ovocitelor amfibienilor. Fibrele axiale reprezintă moleculele de ADNr, pe care sunt atașate alte fibrile, dispuse într-un gradient de lungime, astfel încât capătă aspectul unei pene. Aceste fibrile reprezintă complexe ribonucleoproteinice (RNP) atașate la gene ribozomale corespunzătoare. Acestea prezintă pe lângă porțiunea trascrisă, la nivelul căreia se află atașate complexele RNP, și segmente netrascrise (ADN spațiator = ADN spacer sau silențios) (după O.I. Miller, Jr., 1973)

a moleculelor de ARN, axele ADNr fiind asociate cu molecule de ARN polimeraza. Aceste sectoare activ transcrise sunt separate de zone netranscrise-spațiatori (*spacers*) (fig. 30) Moleculele de ARNr prezintă gradient de lungime, aflându-se în diferite momente ale sintezei lor, rezultând imagini asemănătoare structurii unei pene de pasăre.

15. ETAPE ÎN FORMAREA ARNR 18S; 5, 8S ȘI 28S DINTR-UN TRANSCRIPT PRIMAR

Sectoarele redate în alb, în figura 26, nu reprezintă introni, ci porțiunile excizate din transcriptul primar care separă genele pentru ARNr 18S, 5,8S și 28S, în cadrul unității repetitive de transcripție. La nivelul ADNr aceste sectoare apar între gene, nu în interiorul secvenței genice, așa cum apar intronii. În figurile 31 și 32 sunt redate cele două etape din cadrul prelucrării posttranscripționale a preARNr. Procesarea ARNr precursor este complexă și se asociază cu complexarea moleculelor ARNr rezultate cu proteinele ribozomale corespunzătoare, spre a constitui subunități ribozomale.

Cele mai multe gene ARNr, de la eucariote, nici nu conțin introni. Excepție face *Drosophila melanogaster* al cărei genom conține 285 copii ale genelor ARNr dintre care cam 1/3 conțin introni, dar aceste gene ribozomale ce conțin introni nu sunt transcrise.

În figura 31 se redau etapele succesive în prelucrarea transcriptului unic al unui cistron ribozomal (al unui cluster genic ribozomal). Sectoarele redate în alb nu reprezintă introni, ci sectoare intergenice care vor fi excizate din transciptul primar. La nivelul ADN, aceste sectoare separă genele pentru ARNr 18S, 5,8S și 28S, în cadrul unității repetitive. Procesarea ARNr precursor este complexă și se asociază cu complexarea înalt specifică a moleculelor rezultate cu proteinele ribozomale, spre a se realiza autoasamblarea subunităților ribozomale.

Și moleculele ARNt eucariotic sunt excizate din transcipte mari numite transcripte pre-ARNt. Acestea pot conține una sau mai multe secvențe ARNt. O enzimă similară cu RN-aza P de *Escherichia coli*, implicată în procesarea ARNt precursor a fost izolată din celulele de șoarece.

Cele mai multe informații privind structura ARNt eucariot au fost obținute de la drojdii.

In anul 1965, Robert Holley și colaboratorii săi au elaborat modelul frunzei de trifoi al structurii secundare a moleculei de ARNt pentru alanină, de la drojdia de bere, *Saccharomyces cerevisiae*, pornind de la stabilirea structurii primare a acestei molecule de ARNt, reprezentată de secvența sa de ribonucleotide, care a fost

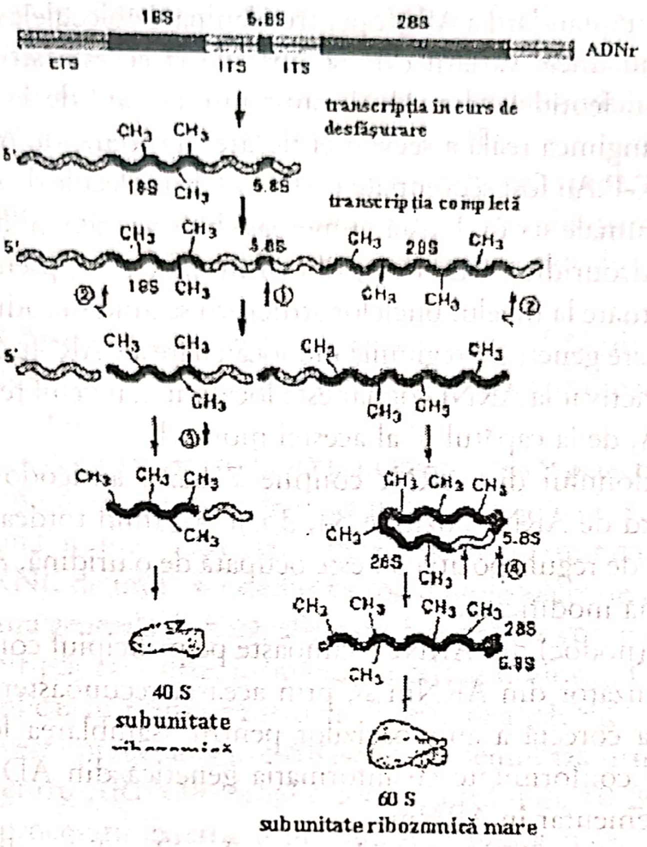

18S
5,8S
28S
ETS
ITS
ITS
ADNr
transcripția în curs de desfășurare
5'
CH₃
18S
5.8S
transcripția completă
28S
①
②
③
④
40 S
subunitate ribozomică
28S
5.8S
60 S
subunitate ribozomică mare

Fig. 31 — Reprezentarea schematică a procesării pre-ARNr în ARN matur ce intră în structura ribozomilor. Metilarea și asocierea cu proteinele ribozomale au loc pe pre-ARNr nascent și continuă în tot cursul transcripției. Clivajul inițial (1) are loc la capătul 5' al ARNr 5,8S și ulterior (2) la joncțiunile secvențelor ARNr 18S și 28S cu spațiatori. Clivajul este redat prin săgeți care sunt numerotate pentru a indica ordinea în care are loc. Legarea de, proteine ribozomale adiționale pentru fiecare subunitate completează asamblarea ribozomului (din Singer și Berg, 1991).

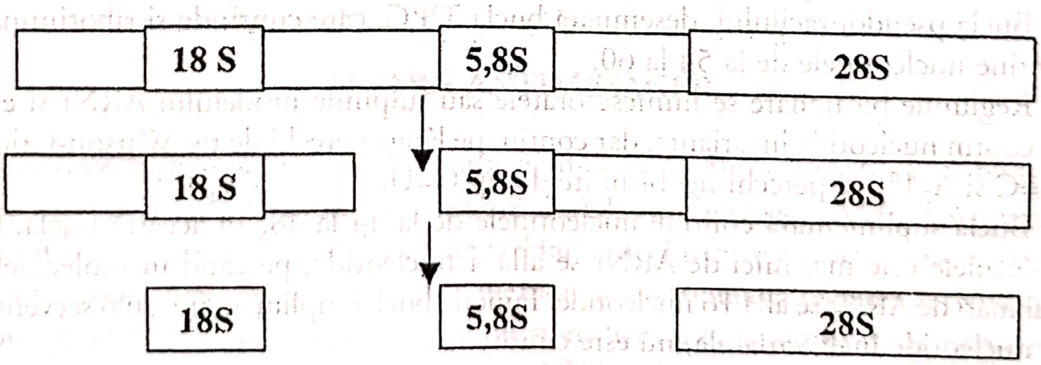

18 S
5,8S
28S
18 S
5,8S
28S
18S
5,8S
28S

Fig. 32 — Etape în clivarea precursorului moleculelor de ARNr la eucariote.

desemnată secvență standard a ARNt pentru alanină. Moleculele de ARNt pentru alți aminoacizi au unele variații care se abat de la această structură standard. Convențional, nucleotidele din ARNt sunt numerotate de la 1 la 76 sau 93 (depinzând de lungimea reală a secvenței fiecărei molecule de ARNt), începând de la terminalul 5'-P.Au fost secvențiate peste 200 de molecule de ARNt la bacterii, drojdii, plante, animale și om. Există numeroase baze azotate modificate în ARNt, printre care dihidrouridina (DHU), riboziltimina (rT), pseudouridina (Ψ) și inozina (I), situate la nivelul buclelor structurii secundare, adică al secvențelor neîmperecheate care generează regiunile monocatenare ale ARNt. Situsul de atașare a aminoacidului activat la ARNt cognat este localizat la nivelul restului adenozină al secvenței CCA, de la capătul 3' al acestei molecule.

Bucla anticodonului din ARNt conține 7 baze, anticodonul ocupând în molecula standard de ARNt pozițiile 34, 35 și 36, fiind totdeauna precedat de două pirimidine; de regulă poziția 34 este ocupată de o uridină. Anticodonul este urmat de o purină modificată.

Anticodonul (nodoc) din ARNt recunoaște pe principiul complementarității codonul corespunzător din ARNm și, prin această recunoaștere moleculară, se realizează selecția corectă a aminoacizilor pentru asamblarea lor într-o catenă polipeptidică, în conformitate cu informația genetică din ADN și care a fost transcrisă complementar în ARNm.

Secvenței standard a ARNt i se adaugă nucleotide adiționale în pozițiile 17, 20 și 47 desemnate 17.1, 17.2, 17.3 etc, 20.1, 20.2, 20,3 etc. și 47.1, 47.2, 47.3, etc. astfel că lungimea diferitelor molecule de ARNt este variabilă între 76 și 93 nucleotide, dar rămân invariante pozițiile 8, 11, 14, 15, 18, 19, 21, 24, 32, 33, 37, 48, 53, 54, 55, 57, 58, 60, 61, 74, 75, 76. Terminalul 3'-OH este ramura acceptoare de aminoacid activat sau ramura CCA.

Bucla dihidrouracilului (DHU) conține bazele 14-21 , dar ea poate conține între pozițiile 17 și 18, încă 3 nucleotide suplimentare, precum și 1-3 nucleotide suplimentare după poziția 19.

Bucla pseudouracilului, desemnată bucla TΨC, care cuprinde și ribotimina, conține nucleotidele de la 54 la 60.

Regiunile bicatenare se numesc brațele sau tulpinile modelului ARNt și ele nu conțin nucleotide invariante, dar conțin, pe lângă perechi de tip Watson-Crick (G≡C si A=U) și perechi neobișnuite de tip G=U.

Bucla suplimentară conține nucleotidele de la 44 la 48. În această buclă, la moleculele cele mai mici de ARNt se află 4 nucleotide, pe când în moleculele mai mari de ARNt se află 16 nucleotide. Funcția buclei suplimentare, cu o secvență de nucleotide înalt variabilă, nu este cunoscută.

In configurația tridimensională, (structură terțiară), analizată prin studii cristalografice, macromolecula ARNt este astfel pliată, încât apar două ramuri helicoidale bicatenare, fiecare având 60Å lungime, fiind dispuse perpendicular una pe cealaltă, conferind astfel moleculei ARNt, în structura sa terțiară, forma de L, cu o ramură ce cuprinde tulpina acceptoare a aminoacidului si bucla TΨC, cealaltă ramură având buclele anticodonului si DHU.

Unul din capetele "L-ului" reprezintă terminalul acceptor, pe când celălalt terminal al "L-ului" reprezintă bucla anticodonului, fiind separate de o distanță de 80 Å. Toate nucleotidele sunt stivuite, cu excepția celor din pozițiile 16, 17, 20, 47 și 76.

Bucla DHU a ARNt este implicată în interacția cu ARN ribozomal, adică cu ribozomul, aflându-se în colțul L-ului, la distanța maximă de capătul 3'- OH CCA și de bucla anticodonului.

Structura tridimensională este realizată prin interacția a 9 perechi de baze numite perechile terțiare de baze, dintre care doar una are împerechere Watson-Crick, fiind G≡C. Cele mai multe dintre cele 9 perechi de baze sunt conservate in toate moleculele de ARNt, de unde s-a dedus că toate moleculele de ARNt trebuie să aibă aceiași structura generală de bază, afirmație bazată și pe constatarea că diferitele molecule de ARNt pot cristaliza, formând un cristal uniform. Grupul 2' OH al ribozelor este implicat în realizarea structurii terțiare a ARNt.

În ceea ce privește procesarea pre-ARNt se consemnează următoarele:

Multe gene pentru ARNt de drojdie conțin introni de 10-20 de baze, astfel că, în acest caz, procesării externe (din afara secvenței genice) la care, ca și în cazul bacteriilor, este supusă molecula precursoare de ARNt de la drojdie, i se adaugă o procesare internă (splicing), producându-se astfel molecule mature de ARNt, ceea ce nu este cazul ARNr.

Mecanismul de procesare a ARNt precursor de la drojdie diferă de cel de la *E. coli* prin aceea că secvența CCA de la terminalul 3' nu este prezentă în transcriptul primar, ci este adăugată ca parte integrantă a mecanismului de procesare. În cazul ARNt nu se aplică regula lui Chambon, neexistând secvențe de baze comune care să marcheze granițele tuturor regiunilor excizate.

16. ARN ANTIMESAGER

Existența unor gene ce sunt transcrise într-un ARNm complementar față de ARNm transcris de pe alte gene funcționale (ARN antimesager), a fost descoperită în anul 1985, când N. Kleckner, de la Harvard University și M. Inouye, de la Steny Brook, din Statele Unite ale Americii, au constatat că reglarea activității a două gene de la bacteria *Escherichia coli* se realizează cu ajutorul unui asemenea ARN antimesager. Pentru producerea de ARN antimesager există în genom gene speciale care dețin o asemenea informație ereditară pentru sinteza de ARN antimesager pentru alte gene. Moleculele de ARN antimesager sunt complementare cu ARNm şi, pe măsură ce acesta este produs, are loc hibridarea moleculară a lor, rezultând ARNm dublu-catenar care nu mai poate funcţiona ca matriţă pentru determinarea secvenţei de aminoacizi, deoarece ribozomii nu se pot asocia cu ARN mesager bicatenar. P.C. Zamecnik şi Z. Stephenson, de la Universitatea din Boston, au utilizat molecule ARN antimesager pentru a bloca in vitro, în culturi de celule aviare, dezvoltarea unui virus carcinogen – virusul sarcomului Rous (VSR), fără a fi afectate celulele gazdă. Acest ARN antimesager a fost reprezentat de oligonucleotide artificiale, lungi de numai 13 nucleotide.

Tot prin folosirea unui ARN antimesager a putut să fie blocată reproducerea bacteriofagului T_4 în celulele bacteriei *Escherichia coli*. În anul 1985, M. Ynouye a elaborat tehnica pentru combaterea unor maladii virale, prin introducerea într-o bacterie a unei gene care specifică sinteza unui ARN antimesager, complementar cu ARNm de la unele virusuri şi utilizarea unui asemenea ARN antimesager, în celulele gazdă eucariote.

După anul 1985, ARN antimesageri au fost dirijaţi contra unor gene care dirijează dezvoltarea normală la *Drosophila melanogaster*. Pe această cale, s-au produs diferite anomalii ale dezvoltării insectei, similare celor produse de mutaţii ale genelor respective, acestea devenind nefuncţionale. Tot astfel, la *Petunia*, s-a utilizat ARN antimesager pentru ARNm ce poartă mesajul genetic al genei ce dirijează sinteza antocianului în petale, blocându-se eficient sinteza pigmentului şi petalele unei varietăţi cu flori roşii apărând necolorate. Genele pentru ARN antimesager nu trebuie confundate cu **genele antisens**, deşi noţiunile de ARN antimesager şi gene antisens au multe elemente comune.

17. GENE ANTISENS

De regulă, doar una dintre cele două catene ale duplexului ADN, pentru un segment dat al său, reprezentând un operon, la procariote, sau o anumită genă, la eucariote, serveşte drept matriţă pentru sinteza unei molecule de ARN. Aceasta este numită catena *antisens* ca direcţie a legăturilor fosfoderice, dar catena **„sens“**, ca funcţionalitate. Catena complementară a ADN, care nu serveşte drept matriţă, pentru sinteza ARNm, se numeşte catenă *„sens“* ca direcţie a legăturilor fosfodiesterice, dar catenă **“nonsens”**, ca funcţionalitate. Pentru un alt segment al macromoleculei de ADN, adică pentru altă genă, o asemenea catenă “sens” devine “nonsens”, pe când catena “nonsens” devine catena “sens” din punctul de vedere al funcţionalităţii ca matriţă.

În anul 1986, o echipă de cercetători de la Universitatea Oregon (SUA), condusă de către profesorul J.P. Adelman, a evidențiat un fapt remarcabil și anume acela că două gene pot ocupa unul și același segment din ADN, fiind plasate față în față, pe cele două catene complementare, antiparalele, una fiind **gena sens**, cealaltă fiind **genă antisens**. Astfel, în sistemul hipotalamohipofizar din creierul de șobolan, funcționează gena pentru hormonul care reglează eliberarea de gonadotropină, desemnat **GnRH**. Această genă este transcrisă de pe o catenă a segmentului din ADN, unde ea este localizată. Cu surprindere, s-a constatat că în mușchiul inimii de șobolan, este transcrisă, la nivelul aceluiași segment al ADN, dar pe catena opusă, complementară, nu funcționează ca matriță pentru sinteza ARNm pentru GnRH . În inimă, catena sens din creier devine catenă antisens și viceversa, catena antisens devine catenă sens pentru unul și același segment din ADN. Această genă transcrisă în inimă s-a numit genă antisens și a fost desemnată cu simbolul **SH**, acronim derivat de la cuvintele englezești *sweet heart* (inimă dulce).

În acest caz, apare o situație cu totul aparte: un același segment ADN poartă pe cele două catene complementare ale sale informație ereditară diferită, secvența uneia reprezentând gena **GnRH**, secvența celeilalte, reprezentând gena **SH**. Dacă gena **GnRH** codifică pentru un hormon necesar dezvoltării sexuale normale, în absența sa apărând sterilitatea, fiind o genă esențială și manifestând o stabilitate remarcabilă, fiind transcrisă activ în creier, gena **SH**, la rândul ei, stabil transcrisă ca genă antisens, în țesutul cardiac, nu este descifrată din punctul de vedere al rolului pe care îl îndeplinește în inimă, prin produsul său de transcripție și traducere.

Și la unele bacterii a fost descoperită transcripția deopotrivă a catenei sens și a catenei, la nivelul aceluiași segment ADN antisens. Diferența dintre genele pentru ARN antimesager și o genă antisens este una de principiu. În primul caz, informația ereditară este localizată în regiuni diferite ale genomului, existând o genă distinctă a cărei informație ereditară dirijează sinteza unui ARN mesager care este *complementar* (*antimesager*) cu ARNm al altei gene, căreia, pe o asemenea cale îi reglează activitatea. În cazul genei antisens însă, același segment de ADN deține informația ereditară pentru produșii genici distincți, sintetizați totuși în celule diferite. Dacă o genă antisens ar fi transcrisă în același timp și în aceeași celulă în care este transcrisă gena sens, ARNm al său ar fi ARN antimesager pentru cealaltă genă și viceversa, ceea ce ar conduce la unirea complementară a ARNm transcris de pe cele două gene și la anihilarea funcționării ambelor gene, deoarece ARNm dublu catenar rezultat nu este activ în sinteza proteinică, ribozomii neputându-se asocia cu un asemenea mesager. Nu este exclus ca în noianul de "erezii" ale eredității descoperite spre sfârșitul secolului XX să apară și o asemenea descoperire! De altfel, se știe că în celula bacteriană, represorul din calea metabolică a pirimidinelor acționează asupra operonului purinelor și viceversa.

18. ATENUAREA TRANSCRIPȚIEI GENETICE LA PROCARIOTE

Prin desprinderea factorului σ (sigma) din holoenzima ARN polimerazică, proces care are loc de îndată ce s-a realizat inițierea sintezei ARN, situsul rămas liber din miezul enzimatic poate fi ocupat de alte proteine modulatoare ale transcripției genice. Însuși transcriptul ARN, prin împerecheri intracatenare, oferă ARN polimerazei instrucțiuni-semnale, cu valoare de pauză sau de terminare a transcripției. La procariote, ribozomul se asociază cu capătul 5' al transcriptului, inițiind traducerea, înainte de a fi fost terminată transcrierea. Prin aceasta, ribozomul însuși poate interveni în atenuarea, pauzarea sau chiar terminalizarea transcripției. ARNt încărcat cu un aminoacid corespunzător poate funcționa ca activator al atenuării transcripției.

Dacă unul din aminoacizii aflați în rezerva celulară devine rar, atunci devin din ce în ce mai rare și ARNt-urile încărcate cu un asemenea aminoacid, fapt care este sesizat de către sistemele reglatoare celulare și care sunt activate, intensificându-se sinteza enzimelor implicate în producerea acelui aminoacid.

Mulți operoni implicați în biosinteza aminoacizilor, așa cum sunt operonii **Trip, His, Leu, Thr, Phe, Ile,** etc. își reglează procesul de transcripție prin mecanismul de atenuare. Semnalul pentru declanșarea acestui mecanism este ARNt încărcat și evenimentul senzor este capacitatea de a traduce o regiune scurtă, codificatoare de peptide, bogată în codoni pentru aminoacidul relevant, localizată în segmentul inițial al transcriptului operonului a cărui transcripție este supusă atenuări.

La nivelul acestei regiuni se poate forma o structură secundară a ARNm la care ARN polimeraza răspunde prin terminarea transcripției.

Informația genetică pentru controlul atenuării transcripției în asemenea operoni este conținută într-o regiune lider, transcrisă din ADN, care are 150-300 perechi de baze, situată între promotor și prima genă structurală a operonului.

În apropierea capătului 5' al fiecărui transcript se află o regiune care poartă mesajul genetic pentru un peptid scurt numit **peptid-lider**. Această regiune conține numeroși codoni pentru aminoacidul care face obiectul atenuării. De exemplu, în operonul **leu** se află patru codoni pentru aminoacidul leucină, corespunzând peptidului lider, pe când în operonul his se află 7 codoni pentru histidină, la nivelul sectorului care dirijează sinteza peptidului lider.

În funcție de nivelul ARNt încărcat cu acești aminoacizi, traducerea acestor codoni reglatori va avea sau nu va avea loc, acest eveniment condiționând dacă transcripția se va termina sau nu, în regiunea lider.

În ADN care conține informația genetică pentru sectorul lider al transcriptului fiecărui operon se pot forma trei structuri secundare cruciale. Prima dintre acestea are valoarea unui semnal de pauză a transcripției, la care ARN polimeraza răspunde printr-o încetare temporală a alungirii catenei. În momentul în care ARN polimeraza se află în modulul pauzal, un ribozom se leagă la liderul transcriptului și inițiază sinteza peptidului lider. Ribozomul traducător eliberează apoi ARN polimeraza pauzată. ARN polimeraza și ribozomul se deplasează apoi, la unison, sincron, fiecare pe matrița lui (ARN polimeraza pe catena antisens a ADN, ribozomul pe ARNm nascent) și o asemenea sincronizare reprezintă caracteristica esențială a atenuării.

Cea de a doua și cea de a treia structură secundară din matrița ADN, respectiv din liderul ARN nascent au un segment comun, formarea lor fiind reciproc exclusivistă. Aceste structuri funcționează ca **antiterminator** și, respectiv ca **terminator** ai transcripției. ARN polimeraza are capacitatea de a recunoaște terminatorul ca semnal STOP al transcripției. Dacă se formează mai întâi antiteminatorul este prevenită formarea terminatorului. Când celula este deficientă într-un ARN încărcat specific cu aminoacidul corespunzător lui, ribozomul care asigură sinteza peptidului lider al operonului reglat rămâne blocat sau “în suspensie”, dacă el nu poate traduce codonii corespunzători.

Acești codoni “reglatori” au loclizări precise în transcript. Un ribozom blocat la una dintre aceste poziții maschează segmentul ARN până la antiterminator, dar neincluzându-l pe acesta, promovează formarea antiterminatorului. Persistența antiterminatorului născând, în timp ce ARN polimeraza continuă transcripția, previne formarea terminatorului și astfel transcripția continuă la nivelul întregului operon.

Când o celulă are nivele corespunzătoare de ARNt încărcat relevant, ribozomul care traduce regiunea codificatoare pentru peptidul lider continuă până la codonul stop. Pe această cale se previne formarea antiterminatorului, dar permite formarea terminatorului și transcripția va fi oprită la nivelul regiunii lider.

19. *ENHANCERII* - AMPLIFICATORI AI TRANSCRIPȚIEI

Gena este o combinație de segmente de ADN care împreună constituie o unitate de funcție a materialului genetic, a cărei exprimare are drept rezultat sinteza unui produs genic funcțional, fie ca moleculă de ARN (ARNr și ARNt), fie ca polipeptid.

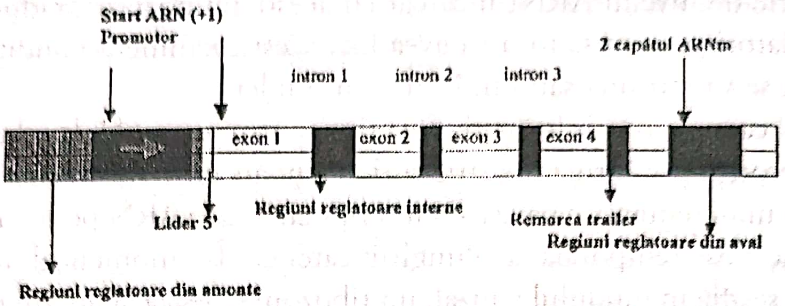


Fig. 3 — Caracteristicile structurale ale unei gene codificatoare de proteine la eucariote. Unitatea de transcripție a genei este definită de situsul start al transcripției (perechea de baze +1) și regiunea în care se termină transcripția care este localizată după terminarea secvenței ARNm matur, rareori aceasta fiind un situs specific. Secvențele cerute pentru inițierea transcripției stau în general în amonte, în cadrul a 100 perechi de nucleotide, înainte de perechea +1, extinzându-se până la mii de perechi de nucleotide. În afară de promotor și secvența reglatoare din amonte, multe gene posedă secvențe reglatoare în cadrul intronilor sau după capătul 3' al ARNm matur. Secvențele reglatoare sunt redate grafic în diferite moduri, spre a sugera posibilitatea unor aranjamente de tipuri distincte de secvențe reglatoare.

Asemenea segmente de ADN care definesc gena sunt reprezentate de unitatea de transcripție, ce cuprinde secvențe minimale necesare pentru inițierea corectă a transcripției (promotorul) și pentru crearea unui terminal 3', corespunzător, al ARN matur precum și secvențele care reglează rata de inițiere a transcripției.

Unitatea de transcripție se referă la secvența continuă de ADN care este transcrisă în transcriptul primar și care include secvența codificatoare fie a unui ARN matur, fie a unui produs proteinic, intronii, secvențele 5' lider și secvența remorcă 3' (**trailer**) care apar în ARN matur, precum și secvențele spațiatoare care sunt eliminate în cursul procesării transcriptelor primare. Secvențele care reglează rata de inițiere a transcripției includ secvențele responsabile pentru inductibilitatea și represia transcripției, precum și pentru condiționarea specificității de celulă, de țesut și temporale a transcripției. Asemenea secvențe sunt de o mare diversitate de structură, poziție și funcție, încât nu s-a putut găsi un termen generic pentru ele. În categoria unor asemenea secvențe se încadrează și **amplificatorii** (**enhancers**) precum și **silențiatorii** (**silencers**) transcripției, reprezentând acele secvențe care influențează inițierea transcripției de la distanță, indiferent de orientarea lor, față de situsul start al transcripției.

Caracteristicile esențiale ale prototipului unei gene codificatoare de proteine la eucariote sunt redate în figura 03.

Nucleotidele care urmează după poziția +1 din aval sunt numerotate în ordine crescătoare și cu sensul +, pe când nucleotidele aflate în amonte de poziția +1, adică din secvența netranscrisă, sunt numerotate cu semnul – (de exemplu –1,-2, ...-150 etc.).

Transcripția eficientă este dependentă de aliniamentele stereospecifice ale unor secvențe distincte, aflate în legătură cu secvența genică, la o distanță mai mică sau mai mare. Asemenea secvențe sunt definite în diferite moduri, așa cum este cazul aliniamentelor dintre secvența repetată de 21/22 perechi de baze, elementele din segmentul de 72 de perechi de baze și alte secvențe din apropierea situsului de start al transcripției la SV 40 (fig. 04). Aliniamentele eficiente sunt în legătură cu legarea proteinelor specifice la diferite motive de secvență, interacțiunile dintre proteine fiind importante pentru promovarea inițierii transcripției și depind de o corespunzătoare orientare spațială reciprocă.

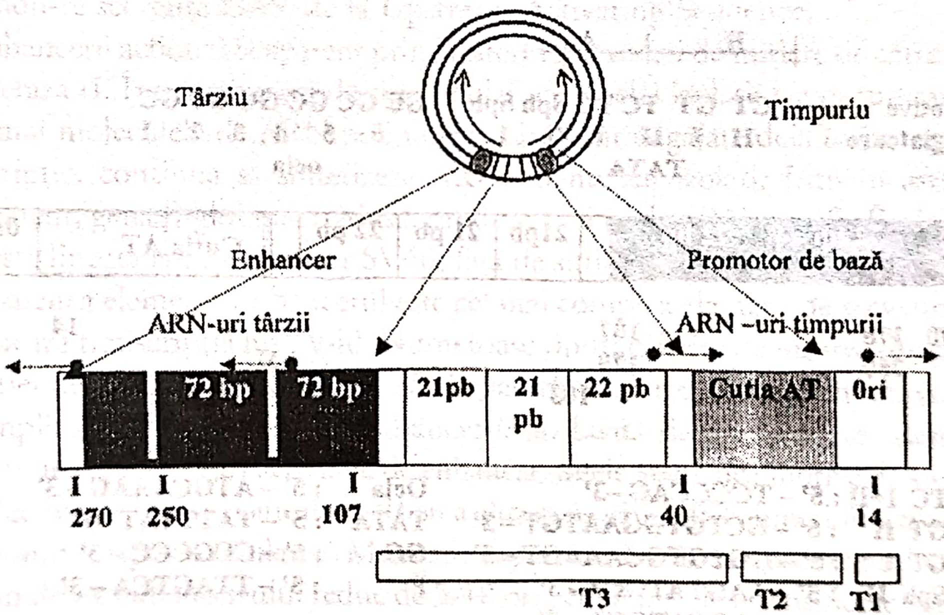
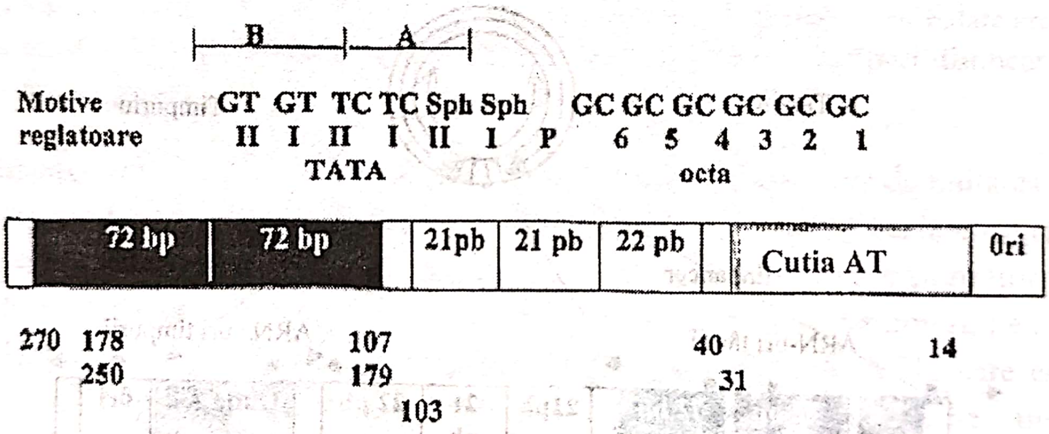


Fig. 4 — Localizarea și organizarea promotorilor regiunilor timpurie și târzie ale genomului SV40. În partea de sus este redată poziția secvențelor reglatoare care guvernează replicarea și transcripția regiunii timpurii și târzii. Localizarea situsurilor start în transcripție pentru ARNm timpuriu și târziu este redată prin săgeți orientate în direcții opuse. Originea replicării ADN (ori) cele două elemente consitutive ale promotorului de bază (cutia AT și repetițiile 21/22), precum și segmentele repetate în tandem, de 72 perechi de baze, care constituie **enhancer**-ul sunt redate într-o versiune mărită, în partea de jos a imaginii. Dreptunghiurile marcate T1, T2 și T3 reprezintă localizările la care antigenul T se leagă, afinitatea de legare fiind T1>T2>T3 (după Singer și Berg, 1991).

Segmentul de ADN de 72 de perechi de baze ale genomului virusului SV 40 intensifică transcripția altor gene. De exemplu, gena β-globinei de la mamifere, aflată într-un plasmid, și care în mod normal nu este transcrisă după transfecție în fibroblaste aflate în cultură, este activată, atunci când un asemenea segment de 72 de perechi de baze este legat la aceasta, la diferite distanțe, în oricare dintre orientările posibile. Datorită capacității sale de a intensifica transcripția dintr-o varietate de regiuni reglatoare, indiferent de distanță sau orientare, raportată la situsurile start, acest element s-a numit ENHANCER – adică intensificator sau amplificator. El a fost inițial identificat în genomul virusului SV40, pentru ca apoi, asemenea elemente, cu aceleași proprietăți, dar cu secvențe diferite, să fie identificate ca reprezentând structuri esențiale ale sistemului de semnalizare a reglării transcripționale la multe gene, la toate organismele eucariote, examinate până acum. Elementele enhancer apar, de asemenea, în regiunile reglatoare ale genelor ribozomale (gene clasa I), transcrise de ARN polimeraza I. Existența unor enhanceri,



TC I+II : 5' – TCCCCAG –3'
GT II : 5' – GCTGTGGAATGT – 3'
GT I : 5' – GGTGTGGAAAGT – 3'
Sph II : 5' – AAGTATGCA – 3'
Sph I : 5' – AAGCATGCA – 3'
Octa : 5' – ATGCAAAG – 3'
TATA : 5' – TATTTAT –3'
GC : 5' – CCGCCC – 3'
P : 5' – TTAGTCA – 3'

Fig. 5 — Motivele de secvență ale elementelor promotorului de bază timpuriu și **enhancer**-ului, din genomul virusului SV40. Motivele de secvență, desemnarea lor și localizările lor în cadrul elementelor promotorului de bază și enhancerului sunt indicate deasupra și dedesubtul liniei care redă ADN. Numerele de dedesubtul ADN reprezintă distanța în perechi de baze din amonte față de situsul start care este localizat în cadrul ori SV40. Segmentul dublu, înnegrit, de 72 de perechi de baze, semnifică aranjamentul repetitiv. Întinderile A și B reprezintă domeniile enhancer care funcționează coordonat. (după Singer și Berg, 1991).

aflați adesea la distanță de o kilobază, fie 5', fie 3' , de punctul start al transcriptului, complică identificarea elementelor promotorului genic.

Segmentul enhancer de SV40 acționează într-o varietate mare de țesuturi diferențiate ale mamiferelor, stimulând, de asemenea, transcripția genelor codificatoare de proteine (gene clasa a II-a) la amfibieni, celule vegetale și chiar la drojdia *Saccharomyces pombe*.

Adesea, segmentul enhancer conferă specificitate de tip de celulă și temporală activării transcripționale a unei anumite gene. Enhancerii asociați cu anumite gene sunt activi doar în anumite stadii ale dezvoltării. De exemplu, enhancerul necesar transcripției genomului virusului **polyoma** eșuează să funcționeze în celulele stem, embrionice, nediferențiate, dar este activat de îndată ce acestea suferă diferențierea. Pe de altă parte, pentru unele gene, enhancerii acționează numai în prezența anumitor inductori. Astfel, transcripția **gal,** la drojdii, este dependentă de activarea dependentă de GAL 4 și necesită prezența unor secvențe specifice în promotorii genelor gal 1, gal2, gal 7, gal 10 și gal 80, asemenea **elemente reglatoare cis** numindu-se secvențe UAS, de la **U**pstream **A**ctivating **S**equence.

Enhancerii acționează aparent prin creșterea frecvenței de inițiere de către ARN polimeraza II. Într-un sistem de tip acelular, cu nuclei izolați, s-a putut constata că numai moleculele de ARN polimerază care sunt angajate deja în procesul de transcripție, continuă să sintetizeze ARN, în nucleii izolați. Într-un astfel de experiment, gena β-globinei tradusă, produce mai mult ARN specific β-globinei, dacă este lincată la un enhancer SV40, față de situația în care gena este lipsită de un asemenea element. Enhancerul este cel mai complex element de secvență care guvernează transcripția lui SV40. Numeroase tipuri diferite de motive din cadrul repetiției de 72 perechi de baze și 25 de perechi de baze, imediat în amonte, au fost implicate ca fiind părți ale enhancer-ului. Luată fiecare în parte, asemenea secvențe au o foarte slabă activitate de enhancer, unele asemenea motive de secvență având activitate de intensificare egală cu a altora, pe când altele funcționează numai în anumite tipuri celulare. Mutațiile apărute în unele asemenea motive structurale ale enhancer-ului reduc de 5-10 ori activitatea de intensificare, pe când înlăturarea în totalitate a enhancerului este însoțită de reducerea ratei de transcripție de câteva sute de ori. De aici, s-a dedus că există o considerabilă redundanță și numai o parțială dependență asupra semnalelor care creează un enhancer funcțional. Gradul și timpul de redundanță a acestor semnale pot avea reală semnificație fiziologică, în transcripția genelor eucariote.

Există două domenii ale enhancer-ului de SV40, desemnate A și B. Domeniul A este alcătuit din motivele P, Sph și octa (de la octamer), pe când motivele pereche GT și TC formează domeniul B al aceluiași element. Cele două domenii A și B pot fi inversate unul față de celălalt sau pot fi distanțate unul față de celălalt, cu distanțe de până la 100 de perechi de baze, fără a fi diminuată apreciabil activitatea de amplificare.

Totuși, deleții în **Sph** sau **octa** din domeniul A sau în motivele GT și TC ale domeniului B alterează activitatea enhancer-ului în măsură diferită, depinzând de celule în care se măsoară rata transcripției. Motivul P nu este necesar pentru funcția enhancer-ului, dar prezența sa face ca transcripția să răspundă la stimulare cu esteri forbol, care activează o proteinkinază celulară.

Motivul **Sph** constă dintr-o repetiție în tandem aproape perfectă a unei secvențe de 9 perechi de baze: 5'- $AAG^{T}_{C}ATGCA$ – 3' și numele său derivă de la existența unui situs de restricție pentru enzima Sph I. **Motivul octameric** (5' – ATGCAAA - 3') este format prin juxtapoziționarea celor două repetiții Sph de 9 perechi de baze. Elementele compuse Sph-octamer permit enhancer-ului să funcționeze într-o mare varietate de celule, incluzând limfocitele. Schimbările în secvențele celor două motive Sph care, de asemenea, nu sunt incluse în secvența octamer, perturbă activitatea enhancer-ului în fibroblaste sau celule epiteliale, fără însă a afecta această activitate în limfocite. Mutațiile afectează capacitatea enhancer-ului de a activa transcripția. Astfel, se deduce că aceste motive reglează transcripția, atât cu specificitate tisulară, cât și fără o asemenea specificitate. Două repetiții adiacente ale 5' – TCCCCAG –3', repetițiile TC și o secvență repetată, bogată în GT, 5' – $G^{C}_{G}TGTGGA^{A}_{T}TGT$ – 3' apar în plus, în amonte de enhancer, GT-I și GT-II contribuind la activitatea enhancer-ului în aceleași celule în care funcționează motivele Sph.

Mutațiile în oricare din motivele GT, sau în TC-II, ca și inserțiile dintre ele, reduc activitatea enhancer-ului, ceea ce înseamnă că cele două motive funcționează cooperant. Secvențele suprapuse în motivele de secvență GT și TC și variații minore ale acestora reprezintă miezul enhancer-ului (5' – $GTGG^{AAA}_{TTT}G$ – 3'), deoarece acestea apar în mulți enhanceri virali sau celulari, dar motivul miez singur nu poate funcționa ca un enhancer.

Dacă un singur motiv sau chiar o pereche de motive ale enhancer-ului nu poate funcționa ca enhancer, multimerii unor asemenea motive sunt activi ca enhancer. De exemplu, tetramerii de motive împerechiate GT sunt tot atât de eficienți ca enhanceri cum este un enhancer complet. Multimerizarea motivului octameric produce o structură care poate substitui enhancerul imunoglobulinic în celulele limfoide, dar este inactiv în fibroblaste. Tot astfel, multimeri ai secvenței miez pot funcționa ca enhancer.

Fiecare dintre motivele SV40, ca și alte secvențe reglatoare **cis**-activatoare reprezintă un situs pentru un factor transcripțional sau factori transcripționali. Colectiv, aceste proteine de legare la ADN și proteine adiționale dobândite prin interacțiuni proteină-proteină se presupune că formează un complex care activează

ARN polimeraza II pentru inițierea transcripției. Pentru înțelegerea exactă a acestor interacțiuni va trebui să fie cunoscuți mai bine factorii de transcripție **trans**-activatori.

20. EDITAREA (*EDITING*) ARNm

Prelucrările posttranscripționale ale transcriptelor primare la eucariote implică o varietate de modificări ale acestora printre care:

- căpăcirea – acoperirea capului 5' (**capping**);
- poliadenilarea capătului 3';
- adăugare de secvențe lider.

Toate aceste modificări afectează terminalii moleculelor ARN.

Eliminarea intronilor influențează secvența finală a regiunii codificatoare. Asemenea modificări fac ca transcriptele rezultate să difere de secvența genică și ele reprezintă schimbări nematrițate, adică realizate după ce molecula de ARN a fost sintetizată pe matriță de ADN. Asemenea modificări au loc deci fără a fi dependente de matrița ADN și uneori chiar la nivelul regiunilor codificatoare.

Editarea este tot un proces de prelucrare posttranscripțională și, în esență reprezintă SCHIMBAREA CITOZINEI ÎN URACIL, în cadrul ARNm. Fenomenul a fost evidențiat mai întâi în ARNm purtător al mesajului genetic pentru apolipoproteina B din mitocondrii, la plante, sau mucegaiul *Physarum polycephalum*. El se realizează în urma unor reacții de modificare sau în urma adiției de nucleotide necodificate, prin erori de activitate a ARN polimerazei. În mod obișnuit, activitatea acestei enzime este foarte exactă, asigurând transcrierea matriței ADN, cu mare fidelitate, pe principiul complementarității. Dacă însă enzima polimerizatoare pierde din acuratețea activității sale, atunci se pot produce erori de includere sau de împerechere care alterează secvența ribonucleotidelor în transcriptul primar. Aceasta este de regulă consecința mutației genice, adică a modificări structural-funcționale a genei pentru ARN polimeraza. Editarea presupune însă modificarea posttranscripțională a transcriptelor primare care au fost corect sintetizate. Cazurile cele mai dramatice de editare, adică de modificare a transcriptelor primare normale se întâlnesc în ARNm din kinetoplastele (mitocondrii modificate) protozoarelor flagelate parazite. Ele sunt reprezentate de adiție și deleție de uridine care fac transcriptul primar să fie atât de alterat secvențial, încât un asemenea transcript editat nu mai poate hibridiza cu matrița ADN, adică cu gena sa! S-a emis și ideea eretică că unele asemenea transcripte ARN nici nu ar mai fi sintetizate pe matriță de ADN. Feagin (1990) implică în desfășurarea editării ARN kinetoplastic unde moleculele mici de ARN, care ar media procesul.

În editarea transcriptului primar al ARNm pentru citocromoxidază (CO 111), de la flagelate parazite *Trypanosoma brucei*, *Leishmania tarentolae* și *Chritidia fasciculata* are loc adiția a patru uridine în apropierea situsului unui cadru de citire al genei (regiune transcrisă și tradusă, reprezentată de o secvență de codoni sens, codificatori pentru aminoacizi) jalonată de codonul de inițiere AUG și de unul dintre cei trei codoni de terminare UAA, UAG sau UGA. Cele mai extinse prelucrări de editare la *Trypanosoma brucei* afectează transcriptele primare ale genelor **CO 111**, **ATPaza 6** și **NADH dehidrogenaza** (ND 7) care sunt în proporție de până la 50% editate prin adiție de uridine, ceea ce face să nu mai corespundă complementar genelor.

Multe din transcriptele primare ARNm ale acestor flagelate parazite sunt lipsite de codonul de inițiere AUG. Dar, prin editare la nivelul capătului 5' al transcriptelor, se creează un codon de inițiere AUG, prin adiția unei uridine între o adenină și o guanină adiacentă, rezultând codonul AUG. Același proces de editare este implicat și în crearea codonilor de terminare în cadrul transcriptelor purtătoare de mesaje genetice pentru **CO 111**, **ATP-ază 6** și **ND7**.

În cadrul procesului de editare poate avea loc însă și eliminarea unor cadre de citire din transcriptele primare, la nivelul terminalului 3', rezultând codoni nonsens, de terminare prematură a mesajului genetic. Editarea terminalului 5', prin care se creează codonul de inițiere este însă mult mai extinsă și mai frecventă. Prin aceste procese de editare la nivelul terminalelor 5' și 3' se crează cadre deschise citirii, adică este conturată secvența de codoni tradusă în catena polipeptidică. Editarea are loc pornind de la 3' la 5', fapt evidențiat prin analiza reacției de polimerizare în lanț (PCR) pentru transcriptele CO111 de *Trypanosoma brucei*, fiind detectate produsele acestei reacții care corespund la transcriptele editate la capătul 3', nu însă și la capătul 5'. Aceasta înseamnă că procesul de editare are loc după terminarea transcripției, deoarece numai astfel devine liber capătul 3'. Granița dintre secvența editată și secvența needitată poate fi abruptă sau treptată (secvență editată parțial, diferențiată de aceea deplin editată). Transcriptul ND7 de *Trypanosoma brucei* are două regiuni sau domenii de editare, distinct separate, care par a fi editate independent.

Fiecare domeniu editat al acestui transcript conține o secvență deplin editată la terminalul 3', o regiune de joncțiune parțial editată și o secvență 5' needitată.

Moleculele parțial editate apar sub forma unor transcripte heterogene dimensional, în probele **Northern blotting**. Regiunile care codifică transcriptele editate tind să aibe un înalt conținut G+C.

Consecința primară a editării ARNm din kinetoplaste este crearea de CADRE DESCHISE CITIRII, SPRE A FI TRADUSE ÎN PROTEINE. Fără intervenția editării nu există în aceste transcripte codonul inițiator AUG, de la care să pornească translația (sinteza catenei polipeptidice). Prin introducerea unui rest U între un A și un G adiacente, editarea crează codonul de inițiere și astfel DESCHIDE CADRUL DE CITIRE sau face ca acesta să fie deschis. Totodată, editarea crează și codoni de terminare UAA, UAG și UGA, la terminalul 3', astfel că se poate închide acest cadru care a fost deschis pentru citire și se încheie corespunzător procesul de translație. Editarea, prin crearea de codoni de inițiere și de terminare, elimină cadre neschimbătoare, codificate genomic, și generează cadre de citire continuu deschise.

Transcriptele editate devin traductibile, AUG-urile create prin editare fiind funcționale, fapt dovedit de constatarea că editarea în aceleași transcripte genice, dar la specii diferite, crează codoni de inițiere esențialmente în același situs. Această constatare a fost făcută în cazul transciptelor genice pentru citocromul b (CYb), pentru CO 111 și pentru MURF2.

La rândul său, procesul de editare este controlat, reglat în cursul vieții tripanosomelor, transcriptele editate variind cantitativ, în funcție de diferite momente ale ciclului de viață al parazitului. Editarea transcriptelor diferitelor gene este diferită ca rată, de aceea, se consideră că editarea are specificitate de genă.

Editarea prezintă o polaritate precisă, de la 3' la 5', ceea ce relevă natura posttranscripțională a procesului. Totodată, se deduce că procesul editării nu este mediat de ribozomi, deoarece aceștia se atașează, de regulă, la terminalul 5' al transcriptului, spre a iniția translația.

În realizarea editării transcriptelor primare este implicat un ipotetic complex enzimatic numit EDITOSOM. Activitățile desfășurate de un asemenea complex enzimatic sunt multiple și complexe:

– tăiere endonucleazică de legături fosfodiesterice;

– adiție sau deleție de uridină;

– activități ligazice, la nivel ARN;

În procesul de editare sunt considerate a fi implicate unele secvențe scurte, complementare secvențelor editate, transcrise ca ARN-uri de 60-80 ribonucleotide care s-au numit **ARN-ghid** (*ARNg*). Asemenea secvențe reprezintă transcripte primare, prezentând la terminalul lor 3' o secvență oligo(U) și o regiune scurtă de împerechere de tip Watson-Crick care s-a numit SECVENȚĂ ANCORĂ sau SECVENȚĂ DE ANCORARE, situată în apropierea capătului 5'. Ancora este complementară unei secvențe needitate, de la capătul 3' al regiunii ce urmează a fi editată, sau, pentru regiunile cu mai mult de un singur ARNg, aceasta este complementară unei secvențe interne editată. Se realizează hibridarea parțială dintre

ARN g și ARNm. Coada oligo(U) stabilizează acest hibrid, prin interacțiune cu o regiune bogată în purină, ce urmează a fi editată. Secvența internă a ARNg este complementară secvenței finale și direcționează adițiile și delețiile de uridină necesare spre a se obține acea secvență. ARNg nu este matriță, în sensul convențional, de vreme ce uridinele, mai curând decât citozinele, sunt adăugate spre a se împerechia cu guaninele din ARNg. Complementaritatea se bazează pe o semnificativă proporție de împerechere G-U. În mecanismul editării, împerecherea de tip G-U capătă, așadar, o deosebită importanță.

Unele transcripte editate au mai multe tipuri de ARNg, dintre care multe se suprapun, în mare măsură, cu ARN editat. Transcriptele excesiv editate necesită intervenția unui număr mare de ARNg-uri.

Aceste ARNg-uri sunt intercalate cu minicercurile și maxicercurile de ADN kinetoplastic de *Leishmania torentolae* și *Trypanosoma brucei*. Fiecare minicerc are capacitatea de codificare pentru trei ARNg-uri. Se presupune că ARNg-urile interacționează concertant cu ipoteticul editosom, spre a specifica secvența finală a transcriptului editat.

S-a propus un model secvențial în trepte al desfășurării editării, susținut de existența multor transcripte parțial editate la *Leishmania torentolae* și un model randomizat al editării, susținut de transcriptele parțial editate ale genelor Cyb și CO 111, de la *Trypanosoma brucei*.

Minicercurile de ADN kinetoplastic dețin secvențele codificatoare pentru ARNg-uri implicate în editarea transcriptelor, de la nivelul maxicercurilor ADN-ului kinetoplastic al tripanosomidelor. Modularea transcrierii ARNg și stabilizarea acestuia sunt responsabile pentru reglarea activității de editare .

Din cele prezentate mai sus, se desprinde clar ideea coevoluției continue a secvențelor ARNg-urilor și secvenței ARNm-urilor din kinetoplaste.

Editarea apare astfel, ca o cale de reglare a expresiei genice, prin mecanisme posttranscripționale și control translațional.

21. INSULATORII CROMATINICI

Genomul eucariot este organizat în domenii cromatinice discrete (Recillas-Targa, 2001) a căror localizare la nivelul nucleului interfazic influențează intrarea și ieșirea din procesele transcripționale ale genelor eucariote.

Domeniile cromatinice sunt entități de cromatină condensată, în care genele nu se exprimă (domenii „închise“) sau de cromatină decondensată în care genele sunt funcționale (domenii „deschise“). Asemenea domenii cromatinice, distincte funcțional, sunt delimitate de secvențe de ADN la nivelul cărora cromatina capătă o configurație particulară.

La rândul lor secvențele intergenice sunt foarte importante pentru expresia genică cu specificitate tisulară și temporală. Un exemplu clasic de asemenea secvență intergenică este regiunea de control a locusului genic al β-globinei umane care conține un **enhancer** și care are o funcție de „deschidere" a cromatinei. Cercetările de pionierat ale lui Harold Weintraub (1999) au demostrat că genele active transcripțional sunt localizate în arii genomice cu o sensibilitate generală la digestie cu endonucleaze. Asemenea regiunii sunt cunoscute sub numele de domenii cromatinice. Acestea prezintă o configurație mai deschisă care favorizează evenimentele reglatoare transcripționale consecutive adaptării unei asemenea configurații. Se consideră că formarea domeniului cromatinic reprezintă unul dintre primele nivele de reglare din cadrul expresiei genice specifice, la eucariote. În plus, studii citologice și biochimice susțin ideea că fiecare domeniu este bine delimitat structural și funcțional. În ultimul timp, acest concept al organizării genomului pe domenii cromatinice s-a îmbogățit cu un element nou și anume acela al **granițelor cromatinice**, denumite ulterior **elemente insulatoare** sau **insulatori cromatinici** (Bell și Felsenfeld 1999). Asemenea elemente au fost descoperite la *Drosophila melanogaster*, fiind apoi evidențiate la mai multe specii de vertebrate (Udvary și colab., 1985) cu rolul de a delimita, adică de a stabili și menține un anumit domeniu cromatinic, stabilind astfel granița dintre locii genici ce sunt supuși unui reglaj diferențiat.

Insulatorii cromatinici delimitează granița dintre locii genici supuși unui reglaj diferențiat, protejând promotorii acestora față de influența elementelor reglatoare învecinate și funcționând într-o manieră polară.

Insulatorul este localizat între cis-efector (enhancer) și promotor, neavând efecte transcripționale stimulatoare sau inhibitoare asupra acestuia, ceea ce îl diferențiază net de elementele reglatoare clasice de tip **enhnacer** și **silențiator**.

Primul și cel mai bine caracterizat insulator cromatinic la vertebrate este acela localizat în regiunea de control a locusului β-globinei de la găină. La nivelul secvenței acestui insulator se află un situs hipersensibil la DNaza I care a fost desemnat **cHS4** și care constituie granița 5' a acestui locus genic (Prileau și colab., 1999). Un fragment de 1,2 Kb care conține un asemenea element **cHS4** prezintă activități insulatoare tipice, incluzând pe acelea de blocare a interacțiunii promotor-enhancer din gena globinei, precum și de protejare a casetelor de expresie de la *Drosophila* (Chung și colab,, 1993), din linii celulare transformate (Pikaart și colab., 1998) și de la mamifere transgenice (Wang și colab., 1997), față de efectele de poziție. Asemenea activități sunt desfășurate în cea mai mare parte de un fragment de 250 pb în cadrul căruia se află miezul sau inima insulatorului, reprezentată de 49 pb ce interacționează cu proteina zinc-finger CTCF care se leagă la ADN.

Insulatorii cromatinici sunt definiți ca elemente neutre transcripțional care au rolul de a preveni extinderea influenței negative sau pozitive de-a lungul cromatinei, spre un anumit promotor. Regiunile subtelomerice antisilențiatoare ale cromozomilor de drojdie au funcție insulatoare deoarece se comportă ca niște bariere față de silențierea dirijată de telomere și asigură totodată propagarea discontinuă a stării de silențiere a cromatinei.

Cele două fațete ale activității de insulare sunt aceea de barieră în calea enhancer-promotor și aceea de discontinuitate în silențiere. În interacțiunea dintre promotor și **enhancer** intervin insulatorii - secvențe de ADN distincte față de primele două elemente de reglare a activității genice și care au o localizare specifică la nivelul domeniilor cromatinice. Domeniile cromatinice ale genomului eucariot sunt domenii de activitate genică, astfel organizate încât insulatorii unui domeniu cromatinic nu interferă cu promotorii altui domeniu cromatinic (Gdula și colab., 1996; Gherasimova și Corces, 1998; Dorsett, 1999).

Elementul insulator împiedică activarea regiunii promotor de către **enhancer**, atunci când insulatorul se intercalează între aceste două elemente ale regiunii reglatoare. Se presupune că insulatorii blochează interacțiunile reglatoare dintre complexele transcripționale localizate în domenii cromatinice adiacente, unele fiind reprezentate de cromatina decondensată (domenii „deschise“), în care genele sunt funcționale, iar altele de cromatină condensată în care genele nu sunt funcționale. Domeniile cromatinice independente funcțional sunt delimitate de acești insulatori cromatinici – elementele de graniță ce constituie veritabile bariere funcționale interpuse între asemenea domenii și care reprezintă, în sine, secvențe specifice de ADN la nivelul cărora cromatina dobândește o configurație particulară. Cel mai cunoscut insulator cromatinic este prezent în retrotranspozonul **gypsy** de la *D. melanogaster*. Inserția acestuia într-o anumită regiune genomică este asociată cu modificarea expresiei genelor adiacente, inducând fenotipuri mutante. Insulatorul **gypsy** este funcțional atunci când motivul său octameric se asociază cu proteinele **su (Hw)** și **mod (mdg4)**, proteine nucleare cu motive **zinc finger**. În cromozomii politeni ai larvelor de stadiul III ale drosofilei au fost identificate peste 200 situsuri în care sunt prezente asemenea proteine.

A fost descris și elementul insulator **Fab-7**[187] care este prezent în complexul **Bithorax** de gene homeotice, separând elementele reglatoare de tip **enhancer** care stimulează activitatea promotorului. **Enhancerii** acționează într-o manieră independentă de distanță și orientare, spre a direcționa pattern-urile spațiale și temporale ale transcripției. Majoritatea **enhancer**-ilor pot interacționa cu o varietate vastă de promotori spre a activa transcripția. Natura promiscuă a activității enhancer-ilor, cuplată cu abilitatea lor de a afecta promotorii de la distanță, sugerează că sunt posibile interacțiuni necorespunzătoare **enhancer-promotor** și, în acest caz, pot fi necesare constrângeri spre a restricționa funcția **enhancer**-ului. În acest proces pot interveni insulatorii cromatinici, precum insulatorul reatrotranspozomului **gypsy** de la *D. melanogaster*. Acesta are proprietăți care îi asigură rolul pe care îl îndeplinește în limitarea acțiunii **enhancer**-ului. Insulatorul **gypsy** izolat din retrotranspozonul **gypsy** conține un cluster de situsuri de legare a proteinei supresoare a perișorilor de pe aripă, desemnată **Su (Hw)** (de la **Supresor of Hairy-wing**). Aceste secvențe blochează funcția **enhancer**-ului numai atunci când se interpun între un **enhancer** și un promotor, ceea ce face să se diferențieze insulatorul gypsy de un **silențiator** comun. În plus, insulatorul **gypsy** protejează o genă și elementele sale reglatoare atât față de efectele genomice de poziție pozitive, cât și față de asemenea efecte negative. Acțiunea pe lungă distanță a **enhancer**-ilor include și capacitatea lor de a stimula transcripția de-a lungul omologilor. La *Drosophila*, aceste efecte sunt cunoscute sub numele de **efecte de transvecție**. Înțelegerea transinteracțiilor dintre regiunile de control ale genelor omoloage s-a realizat prin analiza ca reporter a genei de pigmentație a cuticulei numită **yellow**. Unele combinații de alele **yelllow** prezintă complementație intraalelică, ca urmare a acțiunii cu specificitate tisulară a **enhancer**-ilor **yellow**, prezenți într-unul dintre cromozomi și care stimulează transcripția din promotorul **yellow**, localizat în omologul acestuia.

Activarea specifică a unei gene este influențată de două mecanisme complementare: funcționarea insulatorilor, adică a hotarelor cromatiniene – o clasă specială de reglatori ADN ai activității genice (Cai, 2001) și competiția dintre promotorii genelor învecinate pentru **enhanceri.**

Hotarele cromatinene sau insulatorii sunt de fapt complexe ADN-proteine care joacă un rol important în reglarea genică de la toate eucariotele, incluzând specia umană. Acestea au fost definite operațional prin capacitatea lor de a bloca interacțiunile enhancer-promotor și de a proteja transgenele față de influențele cromatinei învecinate. Deși insulatorii sunt larg răspândiți, nu este cunoscut mecanismul molecular al activității lor. Studii asupra insulatorului din retrotranspozonul **gypsy** de la *D. melanogaster* au dovedit că activitatea de hotar a insulatorului **SuHw** depinde de aranjamentul său **cis**, de numărul de copii și de poziția sa. În mod specific, activitatea de blocare a **enhancer**-ului pe care o exercită insulatorul este abolită prin împerecherea în tandem a elementelor insulatoare. Această constatare sugerează că insulatorii pot interacționa cu elemente asemănătoare în orice parte a genomului sau în situsuri de ancorare din nucleu, spre a realiza împărțirea cromatinei în domenii sau bucle distincte, ceea ce conduce la separarea **enhancer-ilor** de promotori.

Emery și colaboratorii (2000) au cercetat capacitatea insulatorului cromatinic **cHS4** de a bloca efectele de poziție asupra expresiei vectorilor oncoretrovirali flancând un vector reporter cu elementul **cHS4** și analizând expresia vectorului în liniile ceulare, culturi progenitoare primare de măduvă osoasă de șoarece și în analize de transplant. Insulatorul s-a dovedit că nu afectează titrul vectorului și stabilitatea acestuia și într-o anumită orientare a asigurat protecția ambelor gene reporter față de efectele de poziție negative. Aceste rezultate demonstrează capacitatea acestui element de a insula un vector oncoretroviral in vitro și in vivo. Asemenea elemente s-ar putea dovedi valoroase pentru asigurarea expresiei eficiente persistente din acești vectori în cadrul aplicațiilor clinice ale terapiei genice.

În concluzie, insulatorii cromatinici sunt secvențe de ADN care prezintă două proprietăți distincte: 1) pot tampona expresia unei transgene față de efectele de poziție cromozomală; 2) pot interfera cu abilitatea unui **enhancer** de a activa transcripția de la nivelul unui promotor, atunci când se află în intervalul dintre enhancer și promotor (Gerasimova și Corces, 1996; Geyer, 1997; Bell și Felsenfeld, 1999). Astfel, insulatorii joacă un rol important în reglarea expresiei genice la eucariote. În ultimii ani, s-au identificat și caracterizat secvențele insulatoare la numeroase organisme, în structura cromatinică specializată (**scs**) și secvențele **scs** de la *Drosophila* (Kellum și Schedl, 1991, 1992; Zhav și colab., 1995), elementul **Fab-7** al complexului **bithorax** (Hagstrom și colab., 1996; Zhou și colab., 1996; Mhaly și colab., 1997) precum și elementul insulator prezent în regiunea 5' a locusului β-globinei de la găină (Chung și colab., 1993). Alături de proprietățile standard ale sale, acest insulator previne inactivarea transcripțională a transgenelor datorită hipometilării ADN și a deacilării histonelor (Pikaart și colab., 1998). S-a arătat că factorul proteinic de legare la CCTC, desemnat CTCF, se leagă la secvența genei β-globinei de găină și la alți insulatori de la vertebrate (Bell și colab., 1999). Elemente insulatoare au fost identificate pe flancurile locilor genici represați transcripțional HML și HMR și în secvența de activare din amonte a genelor proteinelor ribozomale (Bi și colab, 1999; Donze și colab., 1999).

Deși mecanismul intim de acțiune a insultorului nu este clar, proprietățile particulare ale secvenței acestui element reglator au stat la baza elaborării mai multor modele care încearcă să explice efectele lor asupra expresiei genice, la eucariote. Insulatorii nu inactivează în mod simplu enhancerii, deoarece ei interferă cu activarea transcripțională a unei gene, numai atunci când sunt prezenți între enhanceri și promotori (Cai și Levine, 1995; Scott și Geyer, 1995). Direcționalitatea în efectul insulatorilor pe interacțiunea enhancer-promotor poate fi explicată prin faptul că insulatorii sunt pur și simplu bariere fizice (starea cromatinei) sau chimice (cuplarea cu proteine specifice) față de un proces în care un semnal de la enhancer este transmis spre promotor. Un model extrem admite că insulatorul poate acționa ca „haltă spre promotor“ care forțează factorii de transcripție ce sunt legați la enhancer să interacționeze cu insulatorul și nu cu complexul de transcripție (Geyer, 1997). Un model alternativ sugerează că insulatorii își exercită efectele lor asupra transcripției prin intermediul unor schimbări în structura cromatinei. Acest model este susținut de constatarea că insulatoriii sunt de obicei asociați cu situsuri puternice hipersensibile la DNaza I și au tendința de a separa domenii cromatinice cu grade diferite de condensare (Udvardy și colab., 1985; Prioleau și colab 1999; Bi și colab 1999; Donze și colab 1999).

Insulatorul *gypsy* de la *Drosophila* a fost primul asemenea element identificat în cazul genomului retrotranspozonului *gypsy* (Gdula & colab., 1996) și s-a constatat că este alcătuit dintr-o secvență de 350 pb și cel puțin două proteine. Proteina supresoare a *Hairy-wing* (aripă păroasă) desemnată [su (Hw)] conține 12 motive zinc finger și interacționează cu ADN insulator (Spana și Corces, 1990). Proteina *mod* (*mdg4*) conține un domeniu BTB și interacționează cu su (Hw) (Desm și colab., 1993; Gerasimova și colab., 1995). Cercetările imunoflorescente cu anticorpi anti *su (Hw)* și anti *mod (mdg4)* au indicat prezența acestor proteine în sute de situsuri din cromozomii politeni din glandele salivare. Aceste situsuri nu conțin copii ale retrotranspozonului *gypsy* și se presupune a reprezenta insulatori endogeni, similari cu cel identificat în *gypsy* și care joacă un rol anumit în reglarea normală a expresiei genice la *Drosophila.* Proteina mod (mdg4) este localizată în aproximativ 500 situsuri și se suprapune ca și *su (Hw)* se află în toate situsurile în care această proteină este prezentă.

Insulatorul cromatinic *gypsy* ar putea regla expresia genică prin organizarea ADN în cadrul nucleului, probabil prin stabilirea unor domenii cromatinice de nivel mai înalt ce ar putea juca un rol specific în reglarea normală a transcripției (Gerasimova și colab., 2000). Astfel, *insulatorii cromatinieni ar putea regla expresia genică prin controlul organizării subnucleare a ADN.*

S-a constatat că o secvență ADN localizată în mod normal în interiorul nucleului se deplasează spre periferia nucleului, atunci când insulatorul *gypsy* a fost plasat în cadrul acestei secvențe. Prezența insulatorului *gypsy* a cauzat, de asemenea, ca două secvențe, întâlnite în mod normal în diferite regiuni ale nucleului, să vină împreună într-o singură locație.

Modificările induse de insulatorul *gypsy* în această organizare subnucleară s-au corelat cu modificări în expresia genică care au avut loc în cursul răspunsului la șoc termic. Aceste schimbări globale în transcripție au fost acompaniate de modificări dramatice în distribuția proteinelor insulatoare și ADN insulator. Asemenea rezultate, în opinia cercetătorilor Gerasimova, Byrd și Corces (2000), sugerează că organizarea nucleară impusă de insulatorul *gypsy* asupra fibrei de cromatină este importantă pentru expresia genică.

Studiul formării domeniului cromatinic permite înțelegerea mai bună a proceselor reglatoare critice precum și a modificărilor controlate ale structurii cromatinice. Asemenea studii au ca obiectiv primar identificarea situsurilor hipersensibile la DNaza I care la gena epsilon-globinei embrionare sunt localizate la 15kb în amonte de secvența codificatoare (Razin și colab., 1999). Două dintre aceste situsuri hipersensibile prezintă specificitate eritroidă, pe când cel de al treilea are caracter constitutiv. O parte a acestei regiuni are, de asemenea, capacitatea de a interacționa cu matrixul nuclear.

Insulatorul cromatinic este prezent și la frontiera 5' a domeniului alfa-globinei de găină. Studii funcționale au arătat prezența a 11 activități blocante ale factorului nuclear *zinc-finger* desemnat CTCF și ale CTCF dependent de enhancer, toate reprezentând un element insulator.

Expresia genelor eucariote depinde de activarea complexului de transcripție prin factori legați la secvențele *enhancer*. Aceste elemente *enhancer* acționează pe distanțe lungi și într-o manieră independentă de orientare, spre a orchestra pattern-urile spațiale și temporale complexe ale expresiei genice cerute de dezvoltarea proprie a organismelor eucariote (Thompson și McKnight, 1992). Independența spațială și de orientare a acțiunii *enhancer*-ului sugerează existența unui anumit grad de flexibilitate în interacțiunea sa cu elementele promotoare, interacțiune care este esențială în controlul transcripției. Ca urmare, *trebuie să existe nmecanisme care să includă secvențe reglatoare în cadrul unor domenii specifice de expresie genică, spre a fi evitate interacțiuni promiscuitoare dintre enhanceri și promotori.* Candidații primari pentru asemenea secvențe care și-au asumat funcția de a stabili și delimita aceste domenii sunt aceste *elemente de graniță, insulatorii* (Gerasimiva și Corces, 1996). *Asemenea elemente delimitează teritorii independente de activitate genică prin stabilirea unor domenii de structură cromatinică de ordin mai înalt.* Elementul insulator al retrotranspozonului *gypsy* de la *Drosophyla melanogaster* represează interacțiunile enhancer-promotor, fiind totodată responsabili pentru fenotipurile mutante cauzate de inserția acestui element genetic mobil. Insulatorul *gypsy* inhibă interacțiunea *enhancer*-ilor distali față de promotor cu complexul de transcripție, fără a afecta funcționalitatea *enhancerilor* proximali promotorului. În plus, aceste secvențe pot tampona o genă față de efectele de poziție din cromozom.

Au fost identificate două proteine care se leagă la secvențele insulatoare *gypsy*, fiind responsabile de efectele acestor secvențe asupra transcripției. Proteina supresoare a *Hairy-wing* desemnată su (Hw) afectează funcția enhancerului atât în sectorul din amonte cât și în sectorul din aval față de situsul său de legare, prin inducerea efectului de silențiere similar celui pe care îl are heterocromatina. Proteina modificatoare a *mdg4* desemnată [*mod(mdg)*] interacționează cu *su(Hw)* spre a transforma această represie bidirecțională în efectul polar caracteristic insulatorilor. Aceste efecte par a fi modulate prin schimbări în structura cromatinei.

Elementele insulatoare au fost definite prin două efecte caracteristice asupra expresiei genice: ele facilitează transcripția independentă de poziție a transgenelor integrate stabil în cromozom (Bonifer și colab., 1990; Kellum și Schedl, 1992; Kalos și Fournier, 1995) și tamponează un promotor de la activarea sa de către *enhancer*, atunci când insulatorul este interpus între aceste două elemente ale sistemului reglator (Kellum și Schedl, 1992; Chun și colab., 1993). Expresia unei transgene este determinată de situsul de inserție în care aceasta s-a integrat în genom (Grosveld și colab., 1997). În unele cazuri, *pattern-ul* variegat de expresie a transgenei amintește de efectele transcripției cauzate de proximitatea secvențelor heterocromatice (Levis și colab., 1985). Această constatare sugerează faptul că structura cromatinică de la nivelul secvențelor adiacente situsului de inserție determină nivelul de activare a transgenei și că genomul eucariot conține *regiuni de cromatină „condensată“*, nefavorabile expresiei genice și *regiuni de cromatină „decondensată“*, permisibile transcrierii genice, regiuni „deschise“. S-a postulat că aceste domenii de ordin mai înalt ale cromatinei sunt definite sau delimitate de elemente de graniță reprezentate de secvențe ADN aflate la nivelul unei structuri speciale, particulare a cromatinei care separă regiuni cu diferite grade de permisivitate a expresiei genice (Udvardy și colab., 1985). Asemenea *insulatori cromatinici* pot inhiba interacțiunile de reglare reciprocă dintre semnalele transcripției genice localizate în domenii cromatiniene adiacente. Ca o consecință a acestei proprietăți, apare faptul că insulatorii devin capabili de a inhiba interacțiunea dintre un *enhancer* și un promotor, atunci când ei sunt poziționați între aceste elemente reglatoare fără a afecta integritatea enhancerului. O asemenea proprietate a constituit tocmai elementul cu ajutorul căruia s-au putut identifica elementele insulatoare și s-a realizat disecția lor funcțională.

Numeroase secvențe cu proprietăți acceptate pentru insulatori au fost identificate, dintre care trei au fost studiate în detaliu: 1) structuri cromatinice specializate, desemnate scs sau scs', întâlnite la nivelul insulatorilor genelor *87A hsp* de la *Drosophila melanogaster* (Kellum și Schedl, 1991), secvențele asociate cu situsul hipersensibil constitutiv 5', din locusul beta-globinei de găină (Chun și colab., 1993) și elementul insulator prezent în retrotranspozonul *gypsy* de la *D. melanogaster* (Corces și Geyer, 1991). Secvențele *scs* si *scs'* sunt asociate cu un set de situsuri hipersensibile, ceea ce constitue un indiciu al prezenței unei structuri cromatinice neobișnuite (Udvardy și colab., 1985). Aceste secvențe pot tampona gena *white* față de efectele de poziție cromozomale, atât pozitive cât și negative, după transformarea liniei germinale mediată de elementul P (Kellum și Schedl, 1991). În plus, secvențele *scs* și *scs'* pot insula promotorul *hsp 70* față de activarea sa de către *enhance*-ul genei proteinei vitelusului, desemnată *yp'*, atunci când se află între acestea în gena himeră *hsp 70-lacZ* (Kellum și Schedl, 1992). Aceste proprietăți le are și insulatorul genei β-globină de găină, care poate inhiba activarea promotorului genei γ-globinei, prin regiunea de control a locusului β-globinei (Grosveld și colab., 1987). Interesant apare faptul că insulatorul genei globinei de găină poate să tamponeze și gena *white* față de efectele de poziție cromozomală, atunci când este integrat în linia germinală de la *Drosophila,* ceea ce sugerează faptul că componentele proteinice și mecanismele de acțiune pentru aceste secvențe reglatoare au fost conservate în cursul evoluției.

Insulatorul *gypsy* este localizat în regiunea 5' transcrisă dar netradusă a acestui element și efectele sale caracteristice asupra transcripției stau la baza mecanismului utilizat de elementul mobil *gypsy* în afectarea expresiei genelor adiacente, după inserția sa într-o nouă regiune genomică: *gypsy* determină fenotipuri mutante care afectează doar țesuturi specifice în anumite momente ale dezvoltării, sugerând un efect inhibitor al insulatorului său asupra *enhancer*-ilor specifici care controlează expresia spațio-temporală a genei (Corces și Geyer, 1991). Secvențele *gypsy* manifestă proprietăți tipice pentru elementele insulatoare. Acest retrotranspozon specific pentru *Drosophila melanogaster* este responsabil pentru inducerea unei varietăți de mutații care afectează genele localizate în diferitele arii ale genomului (Modolell și colab., 1983). Una dintre aceste gene, *yellow,* este deosebit de utilă în studiul reglării expresiei genice, deoarece are o structură simplă și produsul său nu este esențial, fiind mai curând implicată în pigmentația structurilor cuticulare ale embrionului, larvei și adultului. Expresia genei *yellow* în cursul dezvoltării la *Drosophila* este controlată de o serie de enhanceri transcripționali cu specificitate tisulară, responsabili pentru expresia *yellow* în țesuturi specifice și în momente diferite ale dezvoltării. Enhancerii care controlează transcripția genei yellow de la nivelul aripilor, cuticulei corpului și structurilor pigmentate ale larvei sunt localizați în regiunea 5' a genei, pe când aceia care controlează expresia *yellow* în perișori și croșete torsale sunt localizați în intron (Geyer și Corces, 1992). Inserția lui *gypsy* în regiunea 5' a lui *yellow* inhibă interacția dintre enhancerii pentru partea din amonte a aripei și cuticulei corpului, dar nu afectează enhancerul larvar, localizat proximal față de promotor (fig. 1B). Analiza revertanților mutațiilor induse de *gypsy* și studiile mutațiilor definite, construite in vitro, au permis identificarea unei regiuni specifice în cadrul *gypsy*, responsabilă pentru acest efect (Geyer și colab., 1988; Smith și Corces, 1995). Această secvență este necesară și suficientă spre a recapitula efectul lui *gypsy* asupra expresiei genice. Când această secvență este inserționată oriunde în regiunea 5' sau în intronul genei *yellow*, enhancerii localizați mai distal față de promotor, fie în amonte, fie în aval, eșuează în activarea transcripției (fig. 1C și D) (Geyer și Corces, 1992). Acest efect nu este specific pentru *yellow* și el afectează în mod regulat secvențe din genele *hsp70* și *cut* de la *Drosophila* (Holdridge și Dorsett, 1991; Jack și colab., 1991). În plus, aceste secvențe pot tampona expresia unei transgene *white* față de efectele de poziție cromozomale, atunci când este prezentă de o parte și de cealaltă a transgenei (Roseman și colab., 1993). Aceste două proprietăți arată că asemenea secvențe au caracteristicile așteptate ale unui element de graniță sau insulator, sugerând că *gypsy* ar putea cauza mutații prin separarea enhancerilor de promotori în domenii diferite de ordin mai înalt ale structurii cromatinei.

Fenotipul mutațiilor induse de *gypsy* poate fi reversat de mutații ale genei nelincate, supresoare ale genei *Hairy-wing [su (Hw)]* ceea ce sugerează că această proteină joacă un rol central în medierea efectelor *gypsy* asupra transcripției și de aici accentuând fenotipul mutant. Această concluzie susține punctul de vedere că proteina *su (Hw)* ar putea interacționa cu secvențele *gypsy*, constituind un component al insulatorului *gypsy*. Proteina *su (Hw)* este o proteină nucleară prezentă în toate celulele de *Drosophila*, în cursul dezvoltării. Proteina conține 12 motive zinc-finger în regiunea centrală, o secvență foarte asemănătoare cu o a doua regiune helix-spirală spiralizată a proteinelor *helix-loop-helix* și două domenii înalt acide, în regiunile amino- și carboxi- terminale ale sale. Proteina *su (Hw)* interacționează direct cu motivul octamer prezent în insulatorul gypsy (25-27) și traiectele flancatoare AT oferă o pliere în ADN care permite contacte suplimentare ale *su (Hw)* cu secvențe localizate pe ambele laturi ale octamerului. Această interacție este mediată de zinc-finger-uri, deoarece mutațiile în aceste structuri interferă cu capacitatea de legare la ADN a proteinei. Mutațiile în regiunea leucine zipper nu au efect asupra legării la ADN, ceea ce sugerează că acest domeniu al proteinei ar putea fi implicat în interacțiunea cu alte componente proteinice ale insulatorului, mai ales că proteina *su (Hw)* purificată se comportă ca un monomer în soluție.

După localizarea nucleară și capacitatea sa de a se lega la ADN, proteina *su (Hw)* se află în cromozomi. La *Drosophila melanogaster*, în cromozomii politeni au fost evidențiate aproximativ 200 situsuri, în larvele de stadiul III, situsuri care nu corespund localizării elementelor *gypsy* (Fig. 1E). Situsurile observate ale localizării *su (Hw)* ar putea astfel corespunde insulatorilor endogeni care pot juca un rol în organizarea genomului în domenii cromatinice de ordin mai înalt care permit reglarea normală a expresiei genice.

O altă mutație în insulatorul *gypsy* este modificatorul lui *mdg 4* și este desemnată *mod(mdg 4)*. Ea cauzează schimbări în fenotipul rezultat din inserția *gypsy* într-o varietate de loci precum *yellow*. Aceste mutații cauzează o amplificare a fenotipului mutant y^2, care determină absența pigmentului din toate situsurile cuticulare ale larvei și adultului. Acest fenotip apare ca urmare a inactivării promotorului sau a inactivării oricărui enhancer care controlează expresia *yellow*. Se afirmă că gena *mod(mdg 4)* ar putea codifica pentru o proteină care se leagă la secvențele insulatoare *gypsy* sau interacționează direct cu *su(Hw)*, această din urmă alternativă fiind susținută de constatarea că mutațiile în *mod(mdg4)* eșuează în a amplifica fenotipul yellow al y^2 în prezența mutațiilor *nul* în gena *su(Hw)*, ceea ce sugerează că prezența proteinei *su(Hw)* este cerută pentru represia transcripției *yellow*.

Gena *mod(mdg4)* a fost clonată, constatându-se că ea codifică cel puțin trei specii de ARN prin *splicing* alternativ (Gerasimova și colab., 1995). Două transcripte majore codifică proteine care conțin un domeniu BTB în regiunea amino-terminală. Acest motiv a fost întâlnit în numeroși factori de transcripție, incluzând factorul GAGA, o proteină considerată a juca rol în remodelarea nucleosomului (Tsukizama, 1994), mediind interacțiile proteină-proteină. Experiențe in vitro au dovedit interacțiunea directă dintre regiunea leucine zipper a *su(Hw)* și domeniul BTB al *(modmdg4)*.

Interacțiunea directă dintre *su(Hw)* și *mod(mdg4)* susține rolul *mod(mdg4)* de parte integrantă a insulatorului *gypsy*. În prezența ambelor proteine, insulatorul afectează funcția *enhancer*-ului în mod unidirecțional; numai *enhancerii* localizați distal față de insulator, raportat la promotor, sunt represați (Fig. 1G). În absența proteinei *mod(mdg4*), la mutanta *mod(mdg4)*, insulatorul pierde efectul său unidirecțional asupra funcției enhancer-ului și acesta dobândește proprietățile tipice unui silențiator; enhancerii localizați fie în amonte, fie în aval față de insulator sunt inactivați, ceea ce explică amplificarea fenotipului *yellow* (Fig. 1D). Acest efect bidirecțional asupra transcripției este cauzat de prezența doar a *su(Hw)* legată la secvențele insulatoare. Astfel, funcția *mod(mdg4*) apare a fi aceea de stabilire a unidirecționalității silențiatorului *su(Hw)*.

Proteina *su(Hw)* determină heterocromatinizarea secvențelor adiacente. Efectul mutațiilor în *mod(mdg4)* nu este reprezentat de o simplă amplificare în fenotipul y^2, spre acela a unei alele *null*, ci mai curând, el cauzează un fenotip variegat caracterizat prin pete de țesut de tip sălbatic într-un fond de celule mutante. Acest fenotip este similar cu acela cauzat de rearanjamente cromozomale care aduc genele *yelow* sau alte gene juxtapuse secvențelor heterocromatice de lângă centromer. Fenotipul variegat se observă la mutantele *mod(mdg4)*, un indiciu că acest fenotip este cauzat doar de proteina *su(Hw)* în absența *mod(mdg4)*. Astfel, proteina *su(Hw)* se leagă la secvențele insulatoare și represează deopotrivă enhancerii din amonte și din aval printr-un efect similar cu cel al heterocromatinei, sugerând că *su(Hw)* ar putea afecta compactarea cromatinei adiacente. Concluzia este interesantă din punctul de vedere al prezenței domeniilor BTB atât în factorul GAGA, cât și în proteina *mod(mdg4*). Legarea lui *mod(mdg4)* la *su(Hw)* inhibă efectul de variegare. Aceasta sugerează că proteina *mod(mdg4)* supresează formarea heterocromatinei, astfel că mutația *mod(mdg4)* se comportă din punct de vedere genetic ca un enhancer al variegării din efectul de poziție. Mutațiile în *mod(mdg4)* se comportă ca variegare a alelei *white-wottled4* care este cauzată de un rearanjament care aduce gena *white* în apropierea heterocromatinei. Această mutație nu se asociază cu *gypsy*, ceea ce înseamnă că proteina *mod(mdg4)* are un rol general, independent de insulatorul *gypsy*, în reglarea structurii cromatinei.

Mutațiile în *su(Hw)* acționează ca supresori ai variegării de tip efect de poziție și reversează efectul amplificator al *mod(mdg4)* asupra w^{m4}.

În insulare și silențiere sunt implicate domenii distincte ale proteinei *su(Hw)*. Proteina *mod(mdg4)* interacționează cu *su(Hw)*, probabil prin regiunea leucină zipper și astfel ocluzionează două domenii acide și constrâng interacțiile lor cu alte proteine. În absența *modmdg4*, aceste domenii acide pot interacționa cu componente ale cromatinei sau ale mașinăriei de transcripție spre a determina efectul de expresie prin variegare bidirecțională a funcției *enhancer*-ului. Efectul silențiator al lui *su(Hw)* poate fi transmis în *trans* la cromozomul omolog. Musculițele heterozigote pentru mutația y^2 prezintă, după cum este de așteptat după natura recesivă a lui y^2, un fenotip sălbatic. Dar, în prezența mutațiilor *mod(mdg4)*, femelele y^2/+ prezintă culoarea mutantă a perișorilor. Această observație poate fi explicată numai dacă enhancer-ul care controlează exprimă gena *yellow* în perișori este inhibat în cromozomul de tip sălbatic. Efectul este dependent de prezența insulatorului *gypsy* pe unul dintre cromozomi și necesită o proteină intactă *su(Hw)*, ceea ce sugerează că inactivarea enhancerului perișorilor este cauzată în trans de către proteina *su(Hw)* în insulatorul *gypsy* în absența *mod(mdg4)*)Fig. 1I). Ca urmare, domeniile acide ale *su(Hw)*, ca și în efectele cis-silențiatoare bidirecțional par, de asemenea, a fi cruciale în determinarea trans-represiei enhancer-ului perișorilor. Efectul trans-inhibitor este cel mai dramatic, atunci când cromozomul de tip sălbatic conține secvențe *gypsy*, dar fără insulator. Asemenea secvențe nu au consecințe fenotipice asupra expresiei genei *yellow*, dar probabil permite o împerechere mai strânsă a celor doi omologi, crescând astfel trans-represia funcției enhancerului perișorilor. Rearanjamentele care dezorganizează împerecherea celor două copii ale genei *yellow* interferă cu efectul trans-represiv, ceea ce sugerează că apoziția strânsă a celor două copii ale genei este importantă spre a permite ca proteina *su(Hw)* să interfere cu funcția enhancer-ului în trans. Situația este comparabilă cu mutația *brown-Dominant* (bw^D) care este cauzată de un rearanjament care aduce secvențele heterocromatice în apropierea genei *brown*. Aceste secvențe nu numai că inhibă expresia genei *bw* în cis, dar interferă totodată cu transcripția copiei genice din celălalt omolog prin analogie cu această situație, efectul trans-represiv asupra enhancer-ului perișorilor poate fi interpretată ca o consecință a formării secvențelor heterocromatice asupra legării proteinei *su(Hw)* la secvențele insulator și a efectului negativ al acestor secvențe asupra enhancer-ilor localizați în cromozomul omolog.

Concluzii:

Elementele de graniță sau insulatoare sunt secvențe reglatoare care separă regiuni cu grade diferite de compactare a cromatinei și afectează doar interacțiunile promotor- enhancer, atunci când sunt integrate în cromozom, ceea ce sugerează rolul metabolismului cromatinei în funcționarea acestor secvențe reglatoare. Rolul modificărilor structurilor cromatinei în funcționarea insulatorilor a fost clar evidențiat în cazul insulatorului prezent în locusul genic al â-globinei. În acest caz, activitatea insulatoare se corelează cu modificări în accesibilitatea ADN la enzimele de restricție cauzate de schimbări în poziționarea nucleosomilor. Studiile asupra insulatorului *gypsy* au indicat că două dintre componentele proteinice ale acestui insulator, identificate până în prezent, determină schimbări în structura cromatinei, ceea ce este o dovadă a rolului configurației sau stării fizice a cromatinei în funcția insulatoare. Acest fapt este dedus din structura proteinei *mod(mdg4)* care este o componentă a insulatorului *gypsy*. Domeniul BTB, localizat în regiunea amino-terminală a *mod(mdg4)* este prezent și în diferiți factori de transcripție, incluzând GAGA, un activator transcripțional codificat de gena *Trithorax-like (Trl)* care funcționează prin a influența structura cromatinei. Mutații ale genei *Trl* determină nivele scăzute ale expresiei genelor homeotice printr-un mecanism care implică împachetarea cromatinei. Chiar și factorul GAGA s-a dovedit a remodela cromatina in vivo. Rolul genei *Trl* în modelarea structurii cromatinei este dedus și din constatarea că mutațiile acestei gene acționează ca enhanceri ai variegării prin efectul de poziție. Mutațiile în gena *mod(mdg4)* prezintă un fenotip variegat afectând gena adiacentă secvențelor insulatoare. În plus, mutațiile *mod(mdg4)* acționează ca enhanceri ai variegării efectului de poziție pentru genele aduse în apropierea heterocromatinei prin rearanjamente cromozomale. Acest rezultate sugerează că represia bidirecțională a funcției *enhancer* cauzată de insulatorul *gypsy* lipsit de proteina *mod(mdg4)* este rezultatul heterocromatinizării secvențelor care se află de o parte și de cealaltă a situsului de inserție a insulatorului. Acest efect este cauzat de proteina *su(Hw)* care afectează toate țesuturile musculiței și poate fi interpretat ca fiind o consecință a inhibiției funcției promotorului prin secvențele heterocromatice sau inhibiția tuturor enhancerilor genei *yellow*. Această posibilitate din urmă este susținută de efectele inhibitoare specifice enhancer-ului, observate atunci când secvențele insulatoare sunt localizate la aproximativ 20kb de gena yellow sau atunci când se analizează expresia genei de tip sălbatic localizată în cromozomul omolog împerecheat. În ambele cazuri, prezența proteinei *su(Hw)* în absența proteinei *mod(mdg4)* are un efect represor asupra enhancerilor individuali, ceea ce sugerează că efectul silențiator are loc la nivelul interacțiunii enhancer-promotor mai curând decât asupra complexului de transcripție. Deoarece schimbările în expresia genică cauzate de variegarea prin efect de poziție sunt concomitente cu modificări în structura cromatinei, silențierea enhancerului observată în mutantele *mod(mdg4)* pot fi, de asemenea, cauzate de schimbările în împachetarea nucleosomilor. Proteina *mod(mdg4)* joacă un rol crucial în modelarea acestor schimbări și în transformarea efectului de silențiere într-o represie unidirecțională caracteristică elementelor insulatoare.

Relația dintre insulatorul *gypsy* și structura cromatinei este dedusă și din constatarea că acest insulator afectează compensația de doză la *Drosophila*. La această musculiță, expresia egală a genelor X-lincate la ambele sexe se datorează dublării intensității de transcripție a genelor din unicul cromozom X al masculului. Acesta se asociază cu asamblarea complexelor proteinice letale multimerice mascul specifice pe cromozomul X al masculului care remodelează structura nucleosomului prin acetilarea specifică a Lys16 din histona H4. Transgenele conținând loci din cromozomul X inserționați în regiuni autozomale eșuează să realizeze completa compensație de doză, ceea ce sugerează efectul inhibitor al cromatinei autozomale asupra procesului de compensație.

Modularea structurii cromatinei cauzată de elementele insulatoare trebuie că afectează interacțiunea dintre un enhancer și un promotor, fără a afecta funcționalitatea enhancerului însuși. Când insulatorul *gypsy* se interpune între doi enhanceri care controlează expresia genei *even-skipped* în striurile (*stripes*) 2 și 3 în cursul embriogenezei la *Drosophila*, are loc represia transcripției de la nivelul promotorului localizat pe cealaltă parte a insulatorului, pe când expresia dintr-un promotor diferit, localizat pe aceeași parte a enhancerului este încă activă. Un efect similar s-a înregistrat la enhancerii prezenți în regiunea intergenică a genelor pentru proteina *yolk* (*yp*) de la *Drosophila* care controlează transcripția genelor *yp*^{1} și *yp*^{2}, divergent exprimate în corpul gras al musculiței: când insulatorul *gypsy* se interpune între promotorul *yp*^{1} și *enhancer*, această genă nu este exprimată, dar gena *yp*^{2} este transcrisă normal. O asemenea concluzie, sugerează că prezența unui insulator nu disrupe interacția factorilor de transcripție cu secvențele enhancerilor. Această cerință a menținerii funcționalității enhancerului pe când are loc inhibiția interacției sale cu promotorii proximali este esențială în înțelegerea mecanismului prin care insulatorii creează și mențin domenii cromatinice independente ale activității genice.

CAPITOLUL VII

RIBOZIMELE — ARN CU PROPRIETĂȚI ENZIMATICE ; INTRONII ȘI MECANISMELE DE SPLICING

1. RIBOZIMELE — MOLECULE ARN CU CAPACITĂȚI CATALITICE

În anul 1980, savantul american T.R. Cech a dovedit că la protozoarul ciliat *Tetrahymena termophila*, molecula matură de ARNr 26S derivă dintr-un precursor de 6,4 kb, prin excizia unui intron de 414 ribonucleotide, în urma unui proces de **splicing**.

Investigațiile realizate de către Cech și colaboratorii, în acest caz, au condus la descoperirea unor aspecte cu totul neașteptate ale procesului de **splicing**. Când s-au adăugat extractele celulare la precursorul ARN, spre a determina dacă în acest proces intervin factori proteinici, autorii au constatat cu surprindere că în varianta martor, lipsită de proteine și care conținea doar precursorul ARN și nucleotidele trifosfați se desfășura **splicing**-ul precursorului ARN. Autorii au crezut că nu este exclus ca o proteină esențială nu a putut fi îndepărtată din precursorul ARN și ea ar fi realizat **splicing**-ul acestuia. Pentru a nu mai exista un asemenea dubiu, autorii au utilizat metoda ADN recombinant, spre a introduce în bacteria ***Escherichia coli*** ADN ce corespunde acestui precursor de 6,4 kb. Bacteria ***E. coli*** nu are molecula ARN 26S și nu poate realiza **splicing**-ul ARN. ADN purificat care codifică precursorul ARN 26S de ***Tetrahymena termophila,*** a fost apoi transcris in vitro spre a obține un substrat ARN sintetic pentru reacția de **splicing**. Rezultatul a fost același: **în prezența nucleotidelor trifosfați, dar în absența oricărei ribonucleaze, precursorul ARN realizează propriul său splicing, prin care își exciza cu precizie intronul de 414 ribonucleotide.** Era pentru prima dată când se constata că O MOLECULĂ DE ARN MANIFESTĂ O ACTIVITATE CATALITICĂ ÎNALT SPECIFICĂ ȘI ÎȘI REALIZEAZĂ PROPRIUL SĂU SPLICING, ÎN ABSENȚA ORICĂREI PROTEINE (fig.1). Intronul de 414 ribonucleotide, la rândul său, își manifestă activitatea de ribozimă, continuând să-și autoexcizeze ribonucleotide în interacție cu cofactorul **guanil**, respectiv

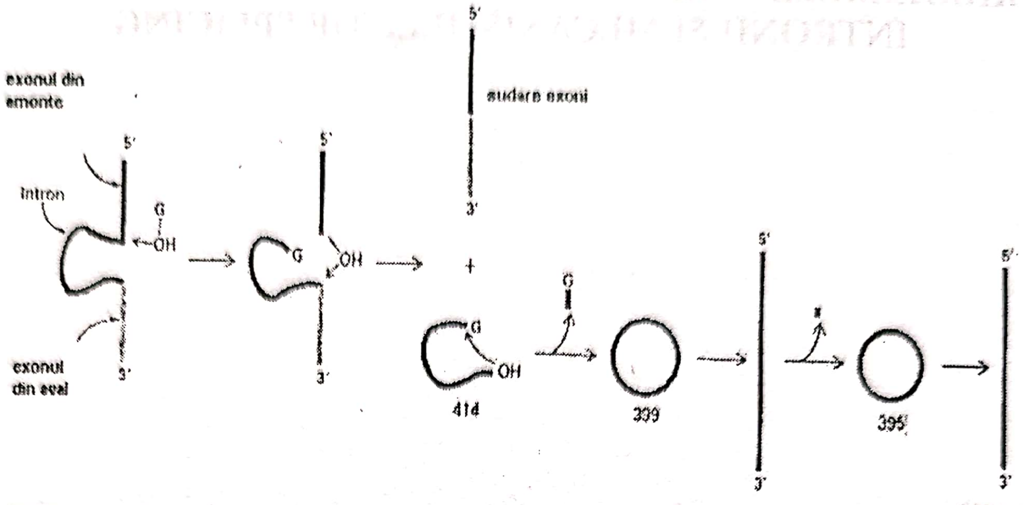


Fig. 1 — Autosplicing-ul unui precursor ARN de la *Tetrahymena.* Un intron de 414 ribonucleotide este eliberat într-o primă reacție de splicing în care guanozina sau un nucleotid cu guanil (G) servește în calitate de cofactor. Acest intron de 414 nucleotide își realizează propriul splicing a doua oară, spre a produce un ARN linear din care s-au pierdut 19 ribonucleotide, devenind ARN L19 care la rândul său este activ catalitic. (după T. Cech, 1986)

guanozină (*G*), din el îndepărtându-se alte 19 ribonucleotide și devenind **ARN L19.** Acest ARN L19 are un **situs de legare G,** și **o secvență ghid.** Secvența ghid este 3'-GGGAGG-5'. Această secvență ghid se împerechează cu un sector 5'-CCCUCU-3' din substratul reprezentat de un ARN de 13 mer, cu secvența 5'-GGCCCUCU**P**AAA-3'. Restul guanozină (G-OH) din GMP, GDP sau GTP servește nu ca sursă de energie, ci ca un grup de atac ce devine încorporat tranzient în acest ARN. El atacă (hidrolizează) la nivelul fosforului din 5A. Atacul este catalizat de însuși ARN L19.

Sub acțiunea ARN L19, pentacitidilatul (C5) este convertit în oligomeri mai lungi (C6-Cn), în acest caz el jucând rol de **polimerază.** Tot sub acțiunea acestui

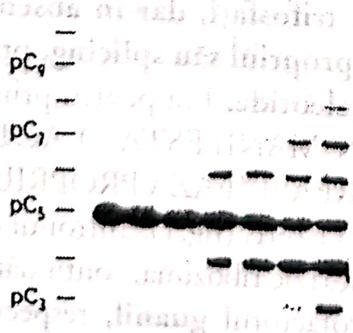


Fig. 2 — Cataliza clivării și alungirii pentacitidilatului (C5) de către ARN L19. Raportul molar al substratului față de enzimă a fost 6. Capătul 5' a fost marcat cu ^{32}P, astfel că produșii de reacție au putut fi vizualizați autoradiografic. (după Zaug și Cech, 1985)

ARN L19, pentacitidilatul este clivat în oligomeri mai scurți (C3 și C4), în acest caz el îndeplinind funcție de **ribonuclează** (fig.2). Astfel, ARN L19 este deopotrivă o ribonuclează și o polimerază, primind denumirea generică de **ribozimă**. Această ribozimă acționeaza mult mai rapid pe C5, decât pe U5 și nu are nici o acțiune pe A5 si G5. Pentru activitatea catalitică a ARN L19, prezența grupării 2'-OH în substrat este o necesitate absolută. Ca și oricare altă enzimă, ARN L19 prezintă un grad înalt de specificitate pentru substrat, cinetică de saturație Michaelis-Menten și susceptibilitate la inhibiție competitivă.

Cum poate o asemenea moleculă de ARN de 395 ribonucleotide să acționeze deopotrivă ca ribonuclează și ca polimerază? Structura sa tridimensională nu este cunoscută, dar pot fi deduse unele aspecte referitoare la mecanismul catalitic pe care îl realizează. Pentacitidilatul se leagă la un situs specific din ARN L19. Mai multe resturi C ale substratului se împerechează cu o secvență bogată în G, din molecula ARN L19. (fig.3)

Are loc o reacție de transesterificare în cadrul căreia se formează o punte fosfodiesterică între G terminal al enzimei și C terminal al substratului spre a se produce un intermediar covalent GpC. Restul guanozină (G) care atacă (hidrolizează) pe A5 este localizat într-un buzunar al ribozimei, unde formează punți

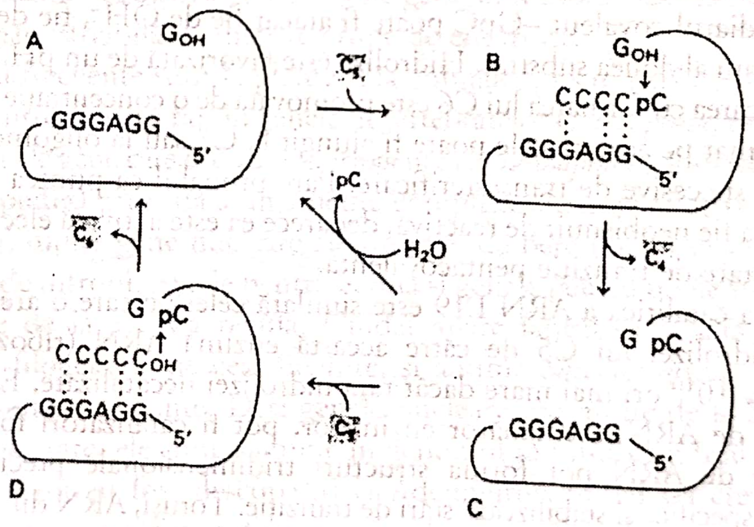


Fig. 3 — Mecanismul catalitic propus pentru ARN L19.
A) Enzima singură; B) C5 se leagă prin punți de hidrogen la enzimă și pC terminal este legat covalent la G terminal al enzimei. Restul de C4 este liber să disocieze de enzimă; C) Hidroliza lui GpC restaurează enzima la starea sa inițială; D) Există alternativa ca pC atașat covalent să poată fi atacat de o a doua moleculă C5 spre a forma C6. (după Zaug și Cech, 1985)

de hidrogen cu două purine. G se leagă le ARN și apoi atacă situsul de splicing 5', spre a forma o punte fosfodiesterică cu capătul 5' al intronului. Această reactie de transesterificare generează un terminal 3'-OH la capătul exonului din amonte. Situsul de clivare 3' este atacat apoi de acest grup nou format 3'-OH aflat la capătul exonului din amonte. Aceasta a doua reacție de transesterificare unește cei doi exoni, concomitent cu eliminarea intronului de 414 ribonucleotide. Au loc apoi încă două runde de **selfsplicing**. Capătul 3'-OH al intronului atacă o punte fosfodiesterică din apropierea capătului 5', spre a forma un cerc și un fragment de 15 ribonucleotide care conțin și G ce a fost încorporat în prima etapă a reacției. Cercul are 399 ribonucleotide și se deschide devenind moleculă lineară care se ciclizează, pierzând încă un fragment de 4 nucleotide. Acest cerc se deschide într-o moleculă lineară de ARN L19, simbol derivat de la **linear minus 19 intervening sequence.** C4 este concomitent eliberat, în cursul acestei reacții de transesterificare. Această nouă legătură fosfodiesterică, foarte labilă, poate fi atacată de apă, spre a elibera pC și a regenera enzima. Această serie de trei reacții succesive (treptate) constitue esența activității ribonucleazice a ARN L19. Există alternativa ca intermediarul enzimatic — GpC să se poată lega la altă moleculă de C5 care apoi atacă — GpC, spre a produce produsul C6 și a fi regenerată enzima. Această etapa stă la baza acțiunii polimerizatoare a ARN L19, care astfel manifestă proprietăți de ARN polimerază.

Intermediarul covalent –GpC poate fi atacat fie de OH^-, fie de către grupul 3'-OH al unui al doilea substrat. Hidroliza este favorizată de un pH înalt, pe când transesterificarea cu formarea lui C6 este promovată de o concentrație a substratului C5. C6 format pe această cale poate fi alungit la C7 sau la oligomeri mai lungi, prin reacții succesive de transesterificare. Pare probabil ca puntea fosfodisterică a lui GpC să fie neobișnuit de reactivă, deoarece ea este activată electrostatic, spre a forma o stare de tranziție pentacovalentă.

Eficiența catalitică a ARN L19 este similară celei pe care o are ribonucleaza A. Rata hidrolizei lui C5 de către această enzimă ARN (ribozimă) este de aproximativ 10^{10} ori mai mare dacât rata hidrolizei necatalizate. Este evident că moleculele de ARN, asemănător enzimelor, pot fi catalizatori foarte eficienți. Moleculele de ARN pot forma structuri tridimensionale precise care leagă substraturi specifice și stabilizează stări de tranziție. Totuși, ARN diferă de proteine prin aceea că nu poate forma nișe nepolare mari. De asemenea, moleculele catalitice ARN sunt mai puțin versatile decât proteinele, deoarece conțin doar patru tipuri de monomeri diferiți, în loc de 20. Așa se explică dece, pe când cele mai multe enzime sunt proteine ubiquitare, ribozimele nu dețin monopolul catalizelor biologice. Enzimele ARN (ribozimele) sunt foarte potrivite pentru recunoașterea și transformarea acizilor nucleici, deoarece ele au același limbaj cu substraturile lor și anume cel bazat pe împerecheri de baze azotate.

Proprietatea de cataliză o are și o componentă ARN a ribonucleazei P. Aceasta este o enzimă ribonucleoproteinică ce conține ca parte prostetică o moleculă de 377 ribonucleotide și care a fost desemnată **ARN M1.** În anul 1983, Sidney Altman a descoperit că această componentă ARN a RN-azei P, de la bacteria ***E. coli,*** are activitate enzimatică. La concentrații mai mari decât cele fiziologice (60mM) de Mg^{2+}, ARN M1 recunoaște situsuri țintă din transcriptele primare și le clivează cu o rată apreciabilă. Acest ARN M1 interacționează în mod specific cu substratul și are grupări catalitice. Rolul componentei proteinice a RN-azei P este secundar; ea crește rata de hidroliză și face ca reacția să se poată desfășura la concentrții mult mai mici de Mg^{2+}.

Aceste ribozime sunt reprezentanți actuali ai lumii ARN, o lume apărută înainte de apariția ADN. În lumea ARN, polinucleotile au prezentat activități autocatalitice și în direcția autoreplicării lor, fără participarea proteinelor.

2. INTRONII ȘI MECANISMELE DE SPLICING

2.1. Introducere

Intronii sunt secvențe necodificatoare ale genelor eucariote, separând secvențele codificatoare - **exonii**, astfel că aceste gene sunt mozaicate. Frecvența genelor mozaicate este variabilă, la diferite grupe de eucariote.

Cele mai frecvente sunt la plante și la animale, precum și la virusurile care le infectează. Intronii sunt rari în genele nevertebratelor (*Drosophila*, nematode, arici de mare). Unele gene care dirijează morfogeneza la *Drosophila* (clusterii **Ultrabitorax** și **Antennapedia**) prezintă aranjamente complexe ale intronilor și exonilor.

Cele mai multe gene nucleare ale drojdiei de bere (*Saccharomyces cerevisiae*) sunt lipsite de introni, genele pentru actină și genele pentru unele specii de ARNt fac excepție de la această regulă. Ciudat apare faptul că la altă drojdie, mai îndepărtată filogenetic de cea dinainte, și anume *Saccharomyces pombe*, genele mozaicate sunt abundente. Deși genele nucleare mozaicate de la *Saccharomyces cerevisiae* sunt rare, ele sunt comune în genomul său mitocondrial.

Deși intronii au fost descoperiți la Adenovirus, inițial s-a crezut că genele mozaicate sunt caracteristice doar eucariotelor, dar a fost descoperită existența lor și la alte virusuri, precum bacteriofagul T4 de *E.coli*, la care gena pentru timidilat sintetază are un intron. Ulterior, au fost descoperiți introni în gena pentru $ARNt^{Ser}$ și în gena pentru ARNr 23S, de la **Archaea.**

Intronii au fost întâlniți în genele nucleare care codifică proteine și sunt deci transcrise în ARNm, în genele pentru ARNr 28S, de la eucariotele inferioare, și într-un subset de gene pentru ARNt.

Genele mozaicate sunt întâlnite, de asemenea, în genomul mitocondrial și cloroplastic, care specifică ARNm, ARNr și ARNt, specifice acestor organite.

La mamifere, aproape toate genele sunt mozaicate. Există și excepții și anume majoritatea genelor care codifică pentru cele 5 fracțiuni histonice, două familii genice care codifică interferon α și interferon β. Gena unică pentru interferonul γ are mulți introni (fig.1). Nu s-au identificat introni în genele pentru ARNr 5,8S și 5S sau în genele ARN U, ARN 7SL și ARN 7SK.

2.2. Intronii în genele nucleare transcrise în ARNm

Intronii din ARNm ai genelor nucleare codificatoare de proteine au fost primii care au fost descoperiți, constatându-se o mare variație în lungimea lor între 100 perechi de baze și 10 kiloperechi de baze.

Lungimea exonilor este și ea variabilă, între 52 și 299 perechi de baze sau de câteva sute sau o mie de perechi de baze. Fiecare intron are o secvență la capătul 5' numită **secvența din amonte** sau **secvența donor** și o secvență 3', din aval sau **secvența acceptor**, aceste secvențe constituindu-se la granițele sale cu exonii numite încă **joncțiuni exon-intron** sau **situsuri de splicing.** Secvențele de nucleotide de la nivelul fiecărei joncțiuni exon-intron au fost remarcabil de conservate, virtual în toate genele pentru ARNm nuclear, la aproape toate speciile care au fost studiate, așa cum rezultă din tabelul de mai jos.

Secvențe consens de la nivelul diferitelor tipuri de situsuri de splicing

Tipul de intron	**Joncțiunea de splicing 5'**	**Joncțiunea de splicing 3'**
PreARNm nuclear (general)	CRG ↓GU $^{A}_{G}$ AGU	Yn AG↓N
PreARNm nuclear (drojdie)	↓GUAUGU	Yn AG↓N
ARNt	N↓N	N↓N
Grup I (ARNr nuclear, ARNm și ARNr mitocondrial)	U↓	G↓
Grup II (ARNm mitocondrial)	↓GUGCG	Yn AU↓
ARNm cloroplastic (Euglena)	↓GUG $^{C}_{U}$ G	YnAUC↓
Bazele azotate indicate apar ca atare în ARN. N=oricare nucleotid; Y= pirimidină, iar n subscript indică multiple pirimidine. R=purină. Literele subliniate indică baze invariante, iar săgeata semnifică situsul de splicing [după Cech T. Cell 44 , (1986)]		

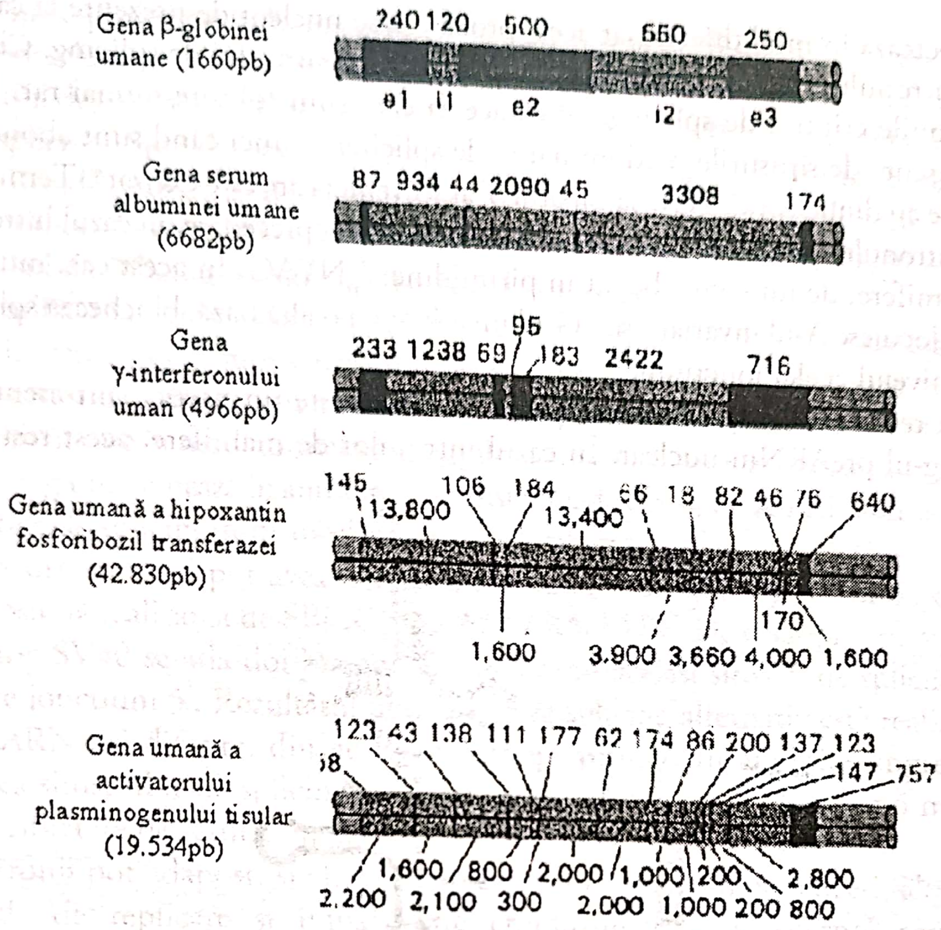

Gena β-globinei umane (1660pb)
240 120 500 660 250
e1 i1 e2 i2 e3
Gena serum albuminei umane (6682pb)
87 934 44 2090 45 3308 174
Gena γ-interferonului uman (4966pb)
95
233 1238 69 183 2422 716
Gena umană a hipoxantin fosforibozil transferazei (42.830pb)
145 106 184 66 18 82 46 76 640
13,800 13,400
1,600 3,900 3,660 4,000 1,600
170
Gena umană a activatorului plasminogenului tisular (19.534pb)
123 43 138 111 177 62 174 86 200 137 123
58 147 757
1,600 800 2,000 1,000 200 2,800
2,200 2,100 300 2,000 1,000 200 800

Fig. 1 — Dimensiunile comparative și numărul exonilor (e) și intronilor (i) în diferite gene umane. Intronii sunt punctați, iar exonii sunt cenușii uniform. În ultimele două exemple, majoritatea exonilor apar ca linii verticale deoarece sunt foarte scurți comparativ cu lungimea totală a genelor. Lungimea intronilor și exonilor este redată în perechi de baze (din Singer și Berg, 1991).

Secvența exonică care flanchează situsul de splicing în 5' este CRG, în care R este o purină. Situsurile de splicing 3' sunt reprezentate cel mai frecvent de o singură G. Fără îndoială că apar variații mari în secvențele care mărginesc intronii, iar mutațiile apărute la acest nivel nu abolesc niciodată splicing-ul, dar pot eventual afecta rata acestui proces. Cele mai invariante caracteristici structurale se înregistrează totuși în interiorul intronului. Primele două nucleotide de la capătul 5' al intronului din ARN precursor sunt virtual totdeauna GU, existând doar două excepții cu GC, următoarele patru nu sunt invariante, deși secvența $^{A}{}_{G}$AGU apare a fi secvență consens. Modificarea fie a G, fie a U la nivelul joncțiunii, abolește în general splicing-ul, pe când dacă asemenea modificări au loc în poziții adiacente, ele afectează în mod diferențiat acest proces. Șase nucleotide prezente la capătul 5' al intronului sunt suficiente pentru funcționarea situsului de splicing. Chiar și joncțiunile criptice de splicing, adică acelea care sunt folosite numai rar, fără a mai discuta de situsurile predominante de splicing, atunci când sunt abolite sau afectate au dinucleotidul GU la capătul 5' al secvenței care este excizată. Terminalul 3' al intronului prezintă invariabil AG, cel mai adesea precedate, în cazul intronilor de mamifere, de un sector bogat în pirimidine Y_nNYAG. În acest caz, mutațiile care înlocuiesc A-ul invariant sau G-ul invariant cu o altă bază, blochează splicing-ul, la nivelul acelei joncțiuni.

Un rest A, de lângă capătul 3' al intronului, este un participant esențial în splicing-ul preARNm nuclear. În cazul intronilor de mamifere, acest rest A nu

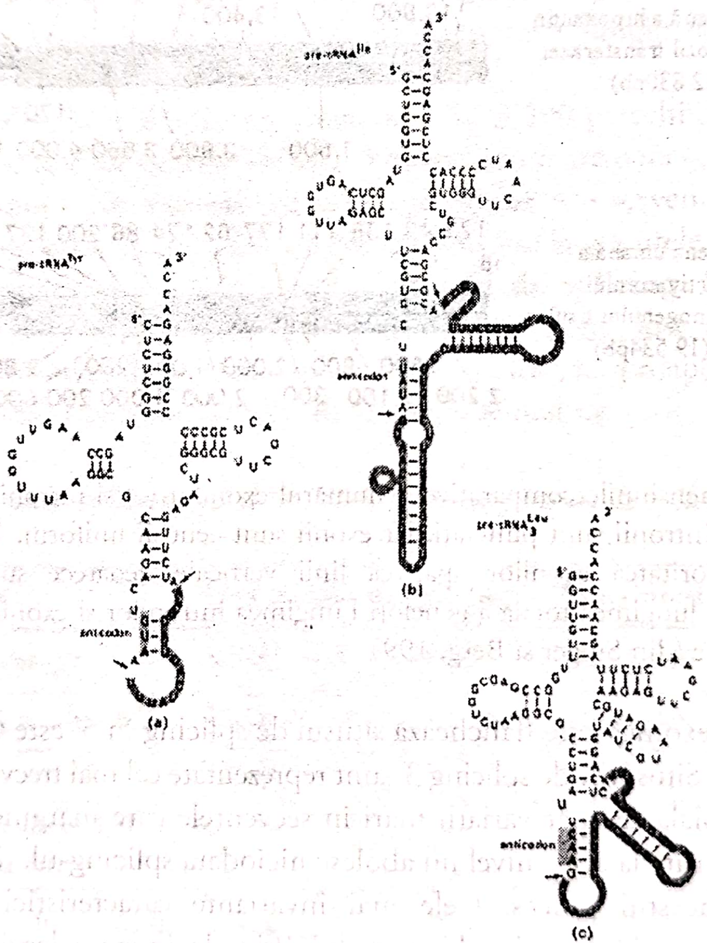


Fig. 2 — Localizarea intronilor în ARNt și a joncțiunilor lor de splicing. Cele trei molecule de ARNt sunt reprezentate prin modelul frunzei de trifoi, pe baza maximalizării împerecherii lor intramoleculare. Secvența intronului este hașurată și se află în vecinătatea anticodonului. Săgețile indică pozițiile joncțiunilor de splicing (din Singer și Berg, 1991).

apare într-o poziție sau secvență invariabilă, deoarece poate fi folositor oricare dintre numeroasele A-uri din cadrul nucleotidelor dintre pozițiile 18 la 37, din amonte de situsul de splicing 3'. Dar, secvențele învecinate acestui A influențează utilizarea sa în splicing. Spre deosebire de cazul mamiferelor, la preARNm-urile nucleare de la drojdii, splicing-ul se realizează pe baza unei secvențe discrete heptanucleotidice, 5'-UACUAAC-3', localizată între nucleotidele 6 și 59, în amonte de situsul de splicing 3', spre a oferi restul A reactiv.

Apariția unor secvențe consens pentru situsul de splicing nu înseamnă totdeauna că un intron poate fi supus acestui proces. Uneori, oricare dintre aceste secvențe ale situsului de splicing sau ambele deodată apar în cadrul exonilor și intronilor în poziții în care în mod normal splicing-ul nu are loc. Totuși, aceste situsuri criptice de splicing funcționează în anumite circumstanțe, de exemplu, atunci când situsurile autentice de splicing sunt modificate sau eliminate.

Uneori, intronii pot avea mai multe joncțiuni de splicing 3' sau 5', ceea ce face posibilă realizarea de SPLICING ALTERNATIV. De exemplu, în regiunea timpurie SV40 se află doi introni, fiecare având același situs 3' de splicing, dar diferite joncțiuni 5'. Rezultatul unui astfel de splicing alternativ este realizarea a două ARN-uri diferite, din același transcript primar. În anumite împrejurări, alegerea situsurilor de splicing alternativ este reglată temporal și într-o manieră cu specificitate de țesut.

Intronii pot adăposti și alte elemente genetice, precum enhanceri, alte gene, semnale de replicare și împachetare cromozomală sau secvențe cerute în împachetarea preARNm în particule ribonucleoproteinice.

2.3. Intronii în genele pentru ARNt

Intronii în genele pentru ARNt variază în lungime de la 14 la aproape 60 nucleotide, invariabilitatea apărând în același loc și anume un nucleotid la partea 3' a anticodonului (fig.2). Secvențele intronice și de la nivelul joncțiunilor diferă marcant în gene care codifică pentru diferite specii de ARNt.

4. Tipurile de introni:

4.1. Introni grup I. Genele nucleare pentru ARNr de la anumite eucariote inferioare precum *Tetrahymena thermophila* și *Physarum polycephalum* au un tip special de intron și un mecanism unic de splicing. Acest tip unic de intron se numește **intron grup I** și el este întâlnit și în cloroplaste, la drojdii, în genele

ARNr mitocondriale de la fungi, în anumite gene mitocondriale, în ARNm de la drojdii și fungi și în numeroase gene ARNt cloroplastice, de la plantele superioare. Și intronul paradoxal din gena pentru timidilat sintetaza, de la fagul T4, este încadrat în acest grup. Acest tip de intron nu a fost identificat în genele vertebratelor. Intronul tip I din preARNr de *Tetrahymena* are aproximativ 400 ribonucleotide, pe când, unii introni tip I din preARNm mitocondrial au peste o mie de nucleotide lungime.

Caracteristicile intronilor de tip I sunt următoarele:

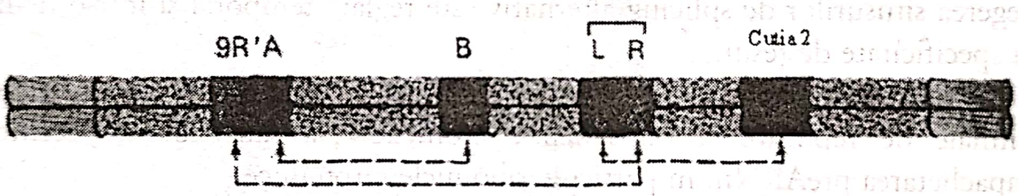
a. **splicing**-ul este un proces de autocataliză și poate avea loc și in vitro, în absența oricăror proteine;

b. informația esențială pentru **splicing** este codificată în interiorul intronului ca secvențe interne multiple, relativ scurte, având loc plierea intronului într-o structură caracteristică, tridimensională;

c. **splicing**-ul *este inițiat de guanozina liberă 5' sau oricare dintre derivații săi 5'-fosforilați;*

d. produșii **splicing**-ului sunt ARNr tăiat și legat, precum și un ARN linear ceva mai scurt decât intronul.

(a) Intronul din ARNt de la Tetrahymena



(b) Intronul din gena pentru citocrom b de drojdie

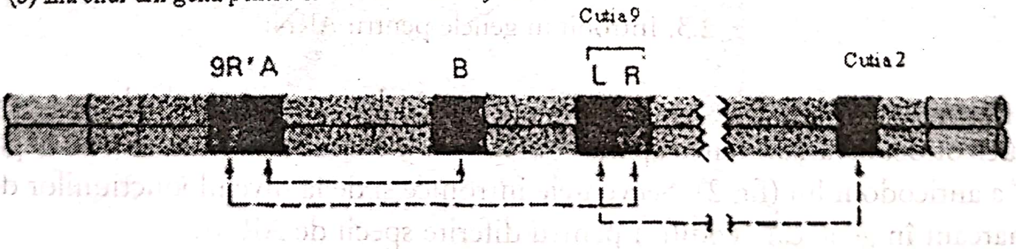


Fig. 3 — Organizarea secvențelor conservate în intronii clasa I nucleari și mitocondriali. Porțiunile terminale, nepunctate, reprezintă exonii. Zonele mai închise din cadrul fiecărui intron sunt complementare și se presupune că se împerechează, așa cum se redă prin dublele săgeți.
(a) Interacțiunile se bazează pe analiza biochimică directă a ARN excizat și pe predicții computerizate.
(b) Aceste interacțiuni se bazează pe comparații ale secvenței filogenetice și pe date genetice (adaptat din T. Cech. Intl. Rev. Cytol. 93, 1985).

Trăsăturile structurale definitorii, comune tuturor intronilor de clasa I sunt deținute în patru secvențe separate de nucleotide, fiecare de câte aproximativ zece nucleotide lungime: AUGCUGGAAA, AAUCAGCAGG, UCAGAGACUACA, AAGAUAUAGUCC. Porțiunea fiecărei secvențe consens, implicată în împerecheri de baze este subliniată.

Localizarea acestor secvențe în intronul ARNr precursor de *Tetrahymena* și în intronul citocromului b mitocondrial de drojdie este prezentată în figura 3, în care se redă și modul în care ele sunt împerecheate. Se admite că împerecherea intramoleculară de baze organizează intronul într-o configurație favorabilă pentru desfășurarea evenimentelor de splicing autocatalitic. Modificarea chimică și substituțiile de situs direcționate la nivelul acestor secvențe împerecheate blochează sau alterează potențialul de splicing al intronului.

Secvențe comparabile cu aceleași capacități de împerechere intramoleculară există în grupul I de introni din gene pentru citocromoxidază mitocondrială unde, de asemenea, alterările mutaționale ale nucleotidelor implicate în crearea structurilor secundare pliate, previn splicing-ul preARNm și expresia enzimei oxidază.

2.4. Introni grup II.

Reprezintă un tip mai rar de introni, față de cei din grupul I. Ei au fost identificați în două gene mitocondriale la drojdii, pentru subunitatea citocromoxidazei

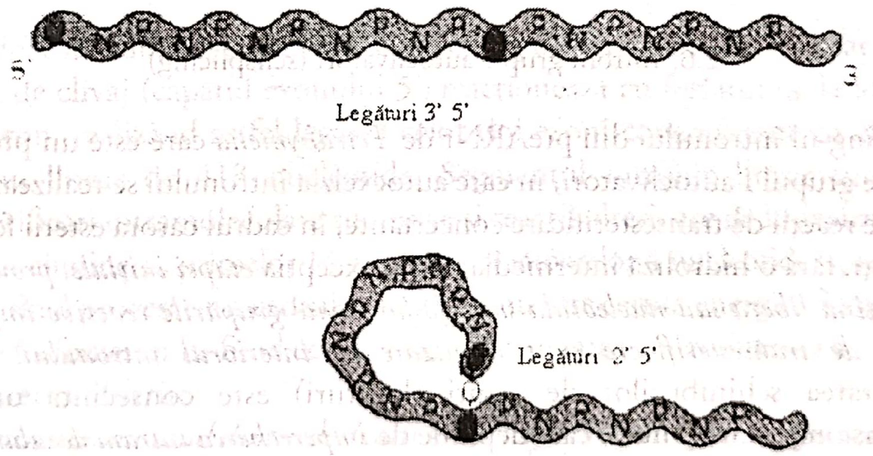


Fig. 4 — Realizarea legăturilor fosfodiesterice care leagă nucleotide aflate la mare distanță în aceeași catenă. Legătura dintre fosfatul 5' și un grup hidroxil 2' al unui nucleotid intern formează o punte fosfodiestirică 2'– 5' și o structură lariată, adică de formă circulară și cu o porțiune liniară (din Singer și Berg, 1991).

și pentru citocrom b. Interesant apare faptul că aceste gene conțin și introni de grup I. Intronii de grup II nu conțin **secvențe consensus**, dar au și ei o structură secundară distinctă, bazată pe împerechere intramoleculară de baze. Și acest tip de introni suferă reacții autoclivatoare in vitro, dar în acest caz, un rest din cadrul intronului și nu o guanozină adăugată la capătul său, inițiază reacția.

A treia diferență esențială între intronii grup I și intronii grup II este aceea că, pe când la grupul I, în timpul splicing-ului se formează intermediari circulari și produși liniari, în grupul II de introni, în cursul desfășurării splicing-ului, aceștia apar ca **lariați**, adică sub forma unor structuri în care capătul 5' fosfat al intronului ARN este legat printr-o punte fosfodiesterică la grupul 2'-OH al unei nucleotide interne (fig.4).

2.5. Introni cu splicing autocatalitic

Mecanismul de autosplicing oferă baza pentru înțelegerea modului în care sunt necesare proteine accesorii și o clasă specială de ribonucleoproteine (snRNP-uri) pentru splicing-ul preARNm nuclear. Autosplicing-ul apare pe calea unei secvențe ordonate de schimburi fosfodiesterice auto-promovate numite transesterificări, astfel că **preARNm funcționează ca enzimă numită ribozimă**, oferind mediul intramolecular și grupe reactive spre a promova o serie de transesterificări specifice, ordonate.

2.6. Introni grup I autoclivatori (selfsplicing)

Splicing-ul intronului din preARNr de *Tetrahymena* care este un prototip de intron de grupul I autoclivatori, în care autoexcizia intronului se realizează printr-o serie de reacții de transesterificare concertante, în cadrul cărora esterii fosfat sunt schimbați, fără o hidroliză intermediară. Cu excepția *etapei inițiale, promovată de o guanozină liberă sau nucleotida sa trifosfat, toate grupările reactive implicate în reacțiile de transesterificare sunt localizate în interiorul intronului.* În plus, specificitatea schimburilor de punți (legături) este consecința organizării tridimensionale a intronului care depinde de *împerecherea intramoleculară de baze dintre blocuri de secvență distante*, dar conservate în intron (fig.5).

Prima etapă în cascada de reacții din cadrul splicing-ului este legarea guanozinei la o secvență intronică.

Perechea necomună de electroni din grupul hidroxil- 3' al guanozinei legate realizează un atac nucleofilic asupra grupului fosfat de la nivelul joncțiunii intron-

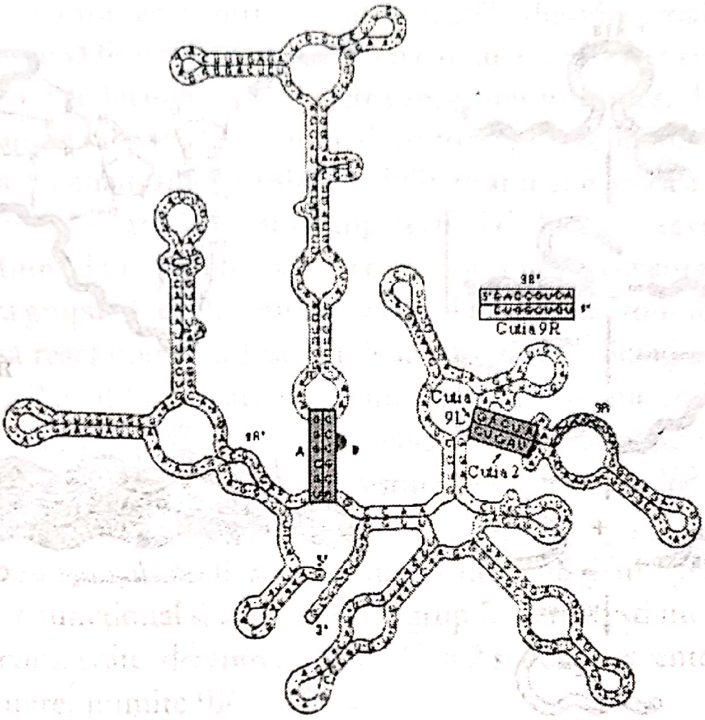


Fig. 5 — Modelul structurii secundare a intronului din ARNr precursor de la *Tetrahymena*, elaborat pe baza utilizării unui program computerizat. În dreptunghiuri sunt redate secvențele care sunt conservate între intronii din ARNr nuclear și intronii din ARNr mitocondrial. Împerecherea dintre regiunile 9R și 9R' stă la baza generării unei structuri pliate tridimensionale (din T. Cech. Intl. Rev. Cytol. 93, 1985).

exon (-UpA-), realizând tăierea la acel nivel (fig.6). Grupul hidroxil creat la nivelul situsului de clivaj (capătul exonului 5') reacționează cu fosfatul de la joncțiunea exon-intron, realizând astfel legarea celor doi exoni concomitent cu eliminarea intronului linear de 413 nucleotide. Segmentul intronic linear suferă două transesterificări intramoleculare succesive și reacții ulterioare de hidroliză, care au ca rezultat eliminarea primelor 15 și apoi a următoarelor 4 nucleotide, spre a genera intronul final procesat. În cadrul procesului nu este cerută energie, fiecare rupere de punte fosfodiesterică fiind compensată de formarea concomitentă a unei punți fosfodiesterice diferite.

Guanozina *sau unul dintre derivații săi 5' fosforilați este specifică pentru inițierea reacției de* **splicing**. Modificarea oricăreia dintre grupele sale 2'sau 3'-hidroxil sau a potențialului de împerechere a guanozinei cu citozina dereglează capacitatea sa de inițiere. Evident, împerecherea guanozinei cu un rest complementar din intron este importantă pentru poziționarea corectă a grupului 3' al guanozinei pentru reacția sa cu fosfatul, la joncțiunea de clivare 5'.

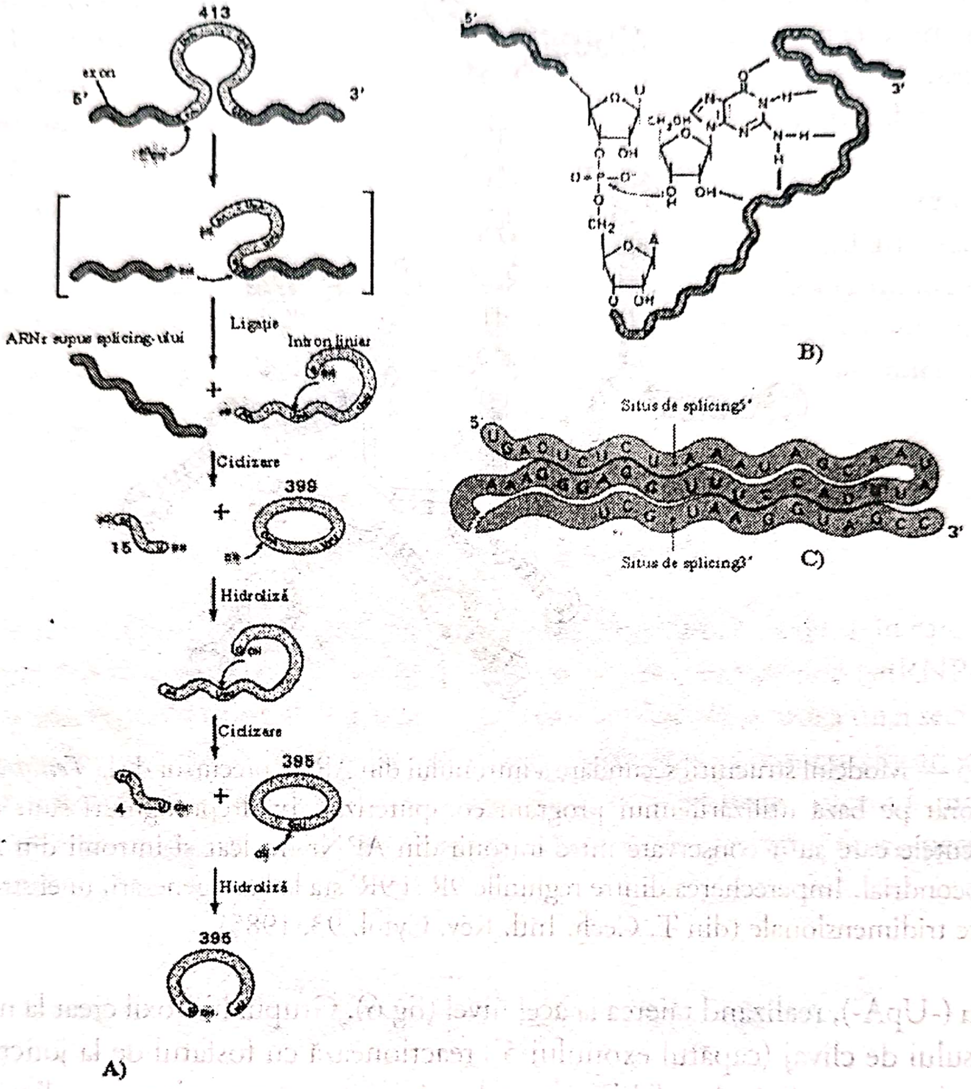

413
exon
5'
3'
Ligație
ARNr supus splicing-ului
Intron liniar
+
Ciclizare
399
15
Hidroliză
Ciclizare
395
4
Hidroliză
395
A)
5'
3'
B)
Situs de splicing5'
5'
3'
Situs de splicing3'
C)

Fig. 6 — Intronii din genele eucariote:
A) Reacții de **selfsplicing** (*autoclivare*) a intronului din grupul I. Se redă cazul intronului din pre-ARNr de la *Tetrahymena thermophila*; porțiunile punctate reprezintă intronii, pe când cele cenușii sunt exonii. În paranteze se redă produsul inițial de clivaj. Toate structurile redate în schemă au fost izolate. Cifrele redau lungimea segmentelor ARN în nucleotide. B) Situsul de legare a guanozinei, din intronul pre-ARNr de la *Tetrahymena*. Intronul este redat punctat și include restul adenilat, la joncțiunea sa 5', iar exonul (redat nepunctat) include uridilatul, la joncțiunea sa 3'. Modul propus de legare a guanozinei prin punți de hidrogen poate implica diferite baze, pentoze sau fosfați care sunt aduși în proxima vecinătate prin realizarea structurii secundare și terțiare. Săgeata indică atacul nucleofilic al grupului 3'-OH al ribozei guanozinei asupra atomului de fosfor de la situsul de splicing 5'. Această **transesterificare** este prima etapă în selfsplicing-ul acestui pre-ARNr (adaptat, după Bass, B.I.. și T. Cech, Nature, 308, 1984, p. 820).

Cele două joncțiuni exon-intron sunt probabil aduse în proximitate, spre a face ca cei doi exoni să fie uniți, în sincronie cu clivajul inițial, efectuat de guanozină. Această manevră este facilitată prin plierea secvenței intronice, de așa manieră, încât să fie juxtapuse cele două joncțiuni, după toate probabilitățile, în vecinătatea situsului de legare a guanozinei. O altă posibilitate ar mai fi aceea a existenței unei secvențe în intron care să poată realiza împerecheri de baze cu secvențele exonice, la ambele joncțiuni de tăiere (fig.6c). Aceasta s-a numit **secvența ghid internă** și ea ar asigura ca grupul 3'-OH, creat prin clivajul joncțiunii exon-intron 5', mediat de guanozină, să reacționeze cu fosfatul de la situsul de splicing 3', spre a forma produsul clivat. Restul G cu care se termină intronul și nucleotidele intronice adiacente specifică situsul de splicing 3'. Schimbări conformaționale în intronul linear eliberat facilitează circularizarea acestuia, după care are loc divizarea sa în oligonucleotide, prin hidroliză ulterioară.

Acest mecanism de autosclivare elucidat la intronul genei pentru ARNr de *Tetrahymena* este funcțional și la alți introni grup I. Toți acești introni au aceleași patru secvențe conservate, desemnate A, B, 9L și 2 și două secvențe neconservate, dar complementare, numite 9R și 9R'.

Cele șase elemente de secvență apar totdeauna în aceeași ordine în intron, 5'-9R'-A-B-9L-9R-2-3'. În plus, majoritatea intronilor din grupul I au, de asemenea, o secvență care poate acționa ca un ghid intern.

Mutațiile care alterează splicing-ul apar intr-o varietate de gene mitocondriale pentru ARNm și ARNr, la drojdii și fungi. Asemenea mutații modifică în general potențialul de împerechere de baze.

Splicing-ul **in vivo** al unor introni de grup I din genele mitocondriale pentru pre-ARNm depinde de aceleași secvențe conservate, cerute pentru splicing-ul pre-ARNr de *Tetrahymena* si produșii de splicing sunt analogi. Dar, aceste pre-ARNm-uri nu suferă self-splicing in vitro. Splicing-ul acestor introni depinde de proteine transactivatoare, codificate în cadrul acelorași gene sau al unor gene deletate, în general prin cadre deschise citirii care se întind chiar la nivelul joncțiunilor intron-exon. Aceste proteine se numesc **maturaze**. Ele asigură plierea intronului pre-ARNm-urilor într-o conformație potrivită, pentru a putea realiza splicing-ul direcțional al pre-ARN. Aceasta explică de ce mutațiile non-sens sau frameshift de la nivelul secvenței intronice, care codifică pentru maturază, împiedică realizarea splicing-ului acelui intron ca și splicing-ul intronilor de grup I din alte gene mitocondriale. Sunt clare cel puțin două caracteristici ale procesului de splicing:

1. spre deosebire de reacția de self-splicing a intronilor de grup I, splicing-ul intronilor de grup II se desfășoară fără a fi necesar un nucleozid inițiator;
2. produsul reacției de splicing este o structură lariată.

Splicing-ul intronilor de grup II are loc în două etape de transesterificare, una implicând clivajul situsului de splicing 5' și a doua clivarea situsului de splicing 3', concomitent cu ligarea celor doi exoni separați anterior de introni.

Diferența fundamentală dintre cele două tipuri de introni constă în natura atacului nucleofilic: **guanozina, în cazul intronilor de grup I și grupul 2'-OH al unui nucleotid aflat undeva în intron, în cazul intronilor de grup II** (fig. 7).

Lariatul rezultă din crearea unei noi legături fosfodiesterice 2'– 5' in mijlocul secvenței ARN.

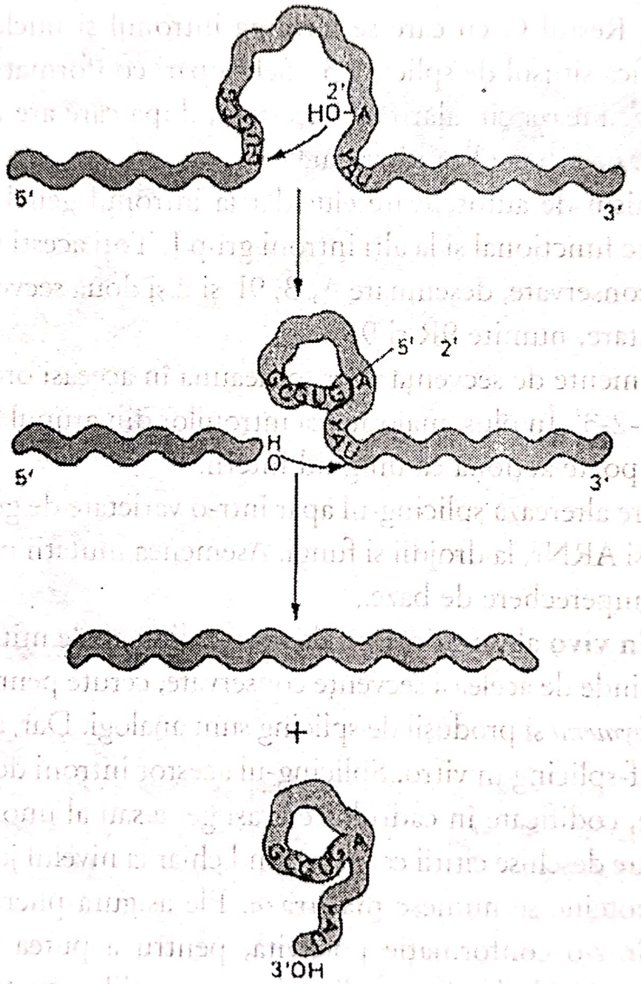


Fig. 7 — Splicing-ul intronilor din grupa II. Un grup 2'-hidroxil (2'-OH) al unui rest adenilat din intron acționează ca element de atac nucleofilic și taie legătura fosfodiesterică la nivelul unui situs de splicing 5'. Unirea grupului 3'-OH al exonului 5' cu fosfatul exonului 3' completează splicingul, rezultând un ARN liniar și un intron lariat care s-a autoexcizat. Numerele redau resturile fosfat la joncțiunile intronice și destinul lor în produsul de splicing, precum și intronul lariat (din Singer și Berg, 1991).

Structura tridimensională a intronului trebuie să aducă grupul 2'-OH, formator de lariat, în imediata vecinătate a situsului de splicing și să activeze transesterificarea sau hidroliza legăturii fosfodiesterice. Selecția punților internucleotidice care urmează a fi clivate este dependentă de implicarea secvenței specifice pentru grupul II de introni, GUGCG, la capătul 5' al intronului și secvența YAU, la capătul 3' al intronului.

2.7. Splicing-ul intronilor din pre-ARNm nuclear

Acest mecanism are loc în nucleu, în cazul unor gene concomitent cu transcripția, în cazul altora, numai după finalizarea acestui proces.

Prima etapă în splicing este asamblarea unui complex de splicing. Cei mai timpurii produși detectați în cursul splicing-ului in vitro, rezultă dintr-un clivaj precis la situsul 5' de splicing: un produs conține exonul 5' și altul conține intronul și exonul 3' (fig. 8). Clivajul la nivelul situsului de splicing de la capătul 5' precede pe cel de la situsul de clivare de la capătul 3'.

Reacția realizează în continuare doi produși: *exonii corect tăiați și sudați și intronul complet eliberat*. Atât produsul inițial de clivaj cât și intronul excizat conțin structuri lariate.

Punctul de ramificare al acestei structuri conține fosfatul 5' al guanozinei, la nivelul joncțiunii intronice, legat în puntea diesterică la grupul 2'-OH al unui rest adenozină.

2.8. Spliceosom

Splicing-ul pre-ARNm nuclear și al intronilor grup II are același rezultat: eliminarea intronului ca o structură lariată și sudarea a două joncțiuni exonice. Dar, spre deosebire de splicing-ul intronilor de grup II, splicing-ul pre-ARNm nuclear necesită o multitudine de factori nucleari-proteine și complexe ribonucleoproteinice (snRNP-uri). Complexul mare, multisubunitar, ce catalizează splicing-ul s-a numit **spliceosom.**

Spliceosomii se asamblează la nivelul intronului, într-o secvență ordonată înainte de clivajul inițial de la situsul de splicing 5' (fig. 9). *Spliceosomul conține intronul legat cu cel puțin cinci snRNP-uri distincte și numeroase proteine adiționale* care, altfel, nu se află asociate cu aceste ribonucleoproteine. Formarea spliceosomilor se bazează pe împerecherea de baze dintre ARN-uri, asocierea de proteine cu ARN și asocierea de proteine cu proteine.

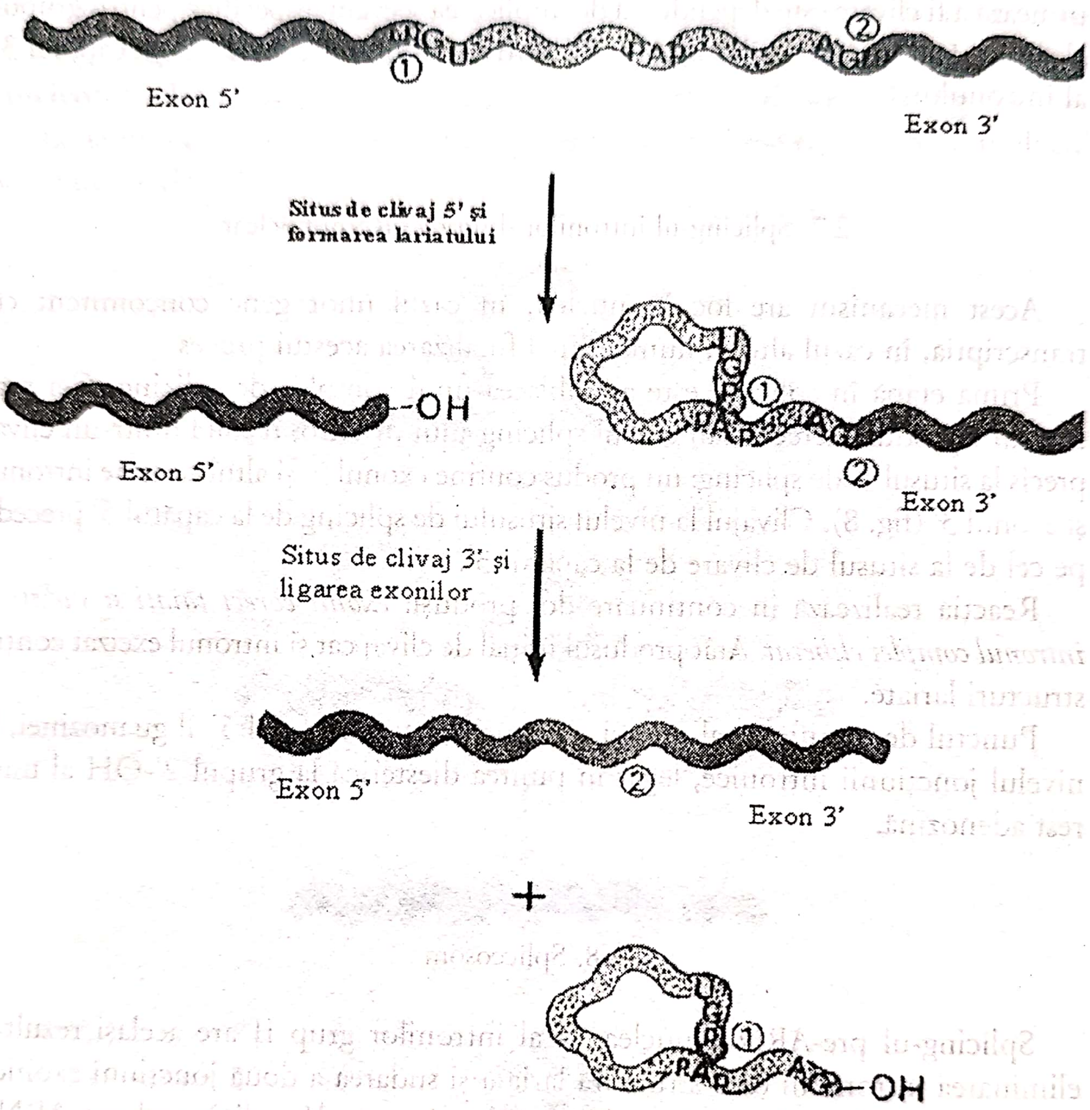

Exon 5'
①
②
Exon 3'
Situs de clivaj 5' și formarea lariatului
-OH
Exon 5'
①
②
Exon 3'
Situs de clivaj 3' și ligarea exonilor
Exon 5'
②
Exon 3'
+
①
-OH

Fig. 8 — Splicing al intronilor din pre-ARNm nuclear. Intronii sunt redați punctat, pe când exonii flancatori sunt redați nepunctat. Reacția generală de splicing implică clivajul la situsul de splicing 5' și formarea concomitentă a legăturii fosfodiesterice 5'–2'. Clivajul situsului de splicing 3' și ligarea capetelor exonice completează procesul. Secvența nucleotidică este prezentă doar pentru situsurile relevante care interacționează (din Singer și Berg, 1991).

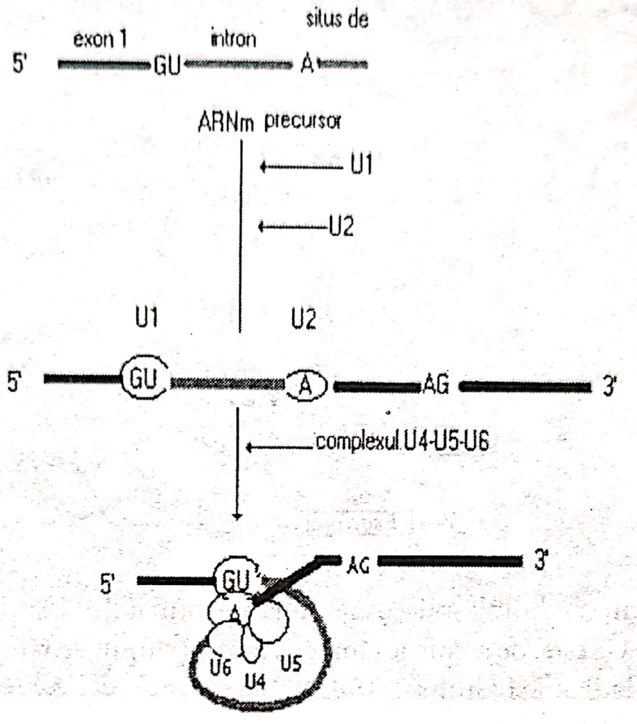


Fig. 19 — Asamblarea spliceosomului: U_1 se leagă la situsul 5' de splicing, iar U_2 la situsul de ramificație. Un complex preformat U_4-U_5-U_6 se asociază apei acestui ansamblu, spre a forma un spliceosom complet (după Streyer, 1995).

Nucleul și citosolul conțin multe tipuri de molecule mici de ARN care au sub 300 nucleotide și care s-au numit **ARNsn** (ARN nucleare mici, de la *small nuclear RNAs*) și **ARNsc** (ARN citoplasmatice mici, de la *small cytoplasmatic RNAs*). Aceste molecule de ARN sunt asociate cu proteine specifice, spre a forma complexe ribonucleoproteinice desemnate **snRNP**, respectiv **scRNP**, numite încă *„snurp"*-uri și *„scurp"*-uri. Spliceosomii sunt ansambluri mari, dinamice de snRNP-uri și precursori ARNm. Splicing-ul este blocat de anticorpi specifici obținuți de la pacienții cu **lupus erythematosus sistemic**, boală autoimună în care se formează complexe de anticorpi și componente nucleare care stau la baza artritei și leziunilor renale.

La mamifere, splicing-ul începe cu recunoasterea situsului de splice de către snRNPU_1. ARN U_1 conține o secvență complementară acestui situs și legarea U_1 sn RNP la un precursor ARNm protejează față de digestie o reginune de 15 nucleotide de la situsul de splicing 5'. Apoi, U_2 sn RNP se leagă la situsul ramificat din intron. Asocierea U_1 și U_2 are drept consecință aducerea capetelor 5' și 3' ale intronului, ceea ce permite lui U_1 să se împerecheze cu situsul de splice 3'. Acestui

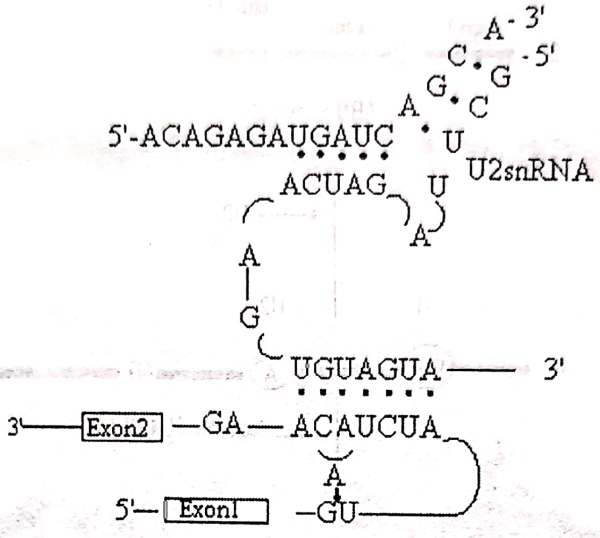


Fig. 10 — Centrul catalitic al spliceosomului este format de U_2snRNA și U_6snRNA care se împerechează. U_2 este, de asemenea împerecheat cu situsul de ramificație al precursorului ARNm (după Madhani și Guthrie, 1992).

complex U_1, U_2, ARNm precursori se adaugă compexul preasamblat U_4-U_5-U_6 spre a forma un spliceosom complet. Se pare că sn RNA U_2 și U_6 formează centrul catalitic al spliceosomului (fig. 10). Spliceosomii au putut fi vizualizați electronomicroscopic (fig. 11).

Identificarea și caracterizarea particulelor snRNP prevede recunoașterea implicării lor în splicing-ul nuclear. Există mai multe tipuri de snRNP în spliceosomii de mamifere care conțin diferite tipuri de ARN nuclear desemnate U_1, U_2, U_4, U_5 și U_6, deoarece au un înalt conținut de uracil și de forme modificate ale acestuia, fiecare apărând într-un snRNP specific. De exemplu, ARN U_4 și ARN U_6, conțin multiple împerecheri de baze între ele și intră într-un snRNP specific. ARN U_3 intră în snRNP care participă în splicing-ul pre-ARNr de la nivelul nucleolului. ARN U_7 intră în SNrnp care este implicat în crearea capetelor 3' ale ARNm pentru histone, iar ARN U_{11} a fost implicat în poliadenilarea ARNm. Există multe alte tipuri de snRNP în nucleul mamiferelor, cu structură și funcții încă necunoscute.

Secvența de nucleotide a ARN U de la vertebrate prezintă o identitate de 95%. Același grad de identitate se înregistrează între ARN U1 de la *Drosophila* și de la om și omologie extinsă de secvență se înregistrează între aceste ARN U și cele de la arici de mare, *Tetrahymena, Dictyostellum*, drojdie și dinoflagelate, fiecare specie având însă și secvențe unice, specifice. Această conservare extraordinară a secvenței ARN U arată că participarea lor în etape specifice din procesarea ARN este o reacție fundamentală care s-a diferențiat de timpuriu, în cursul evoluției.

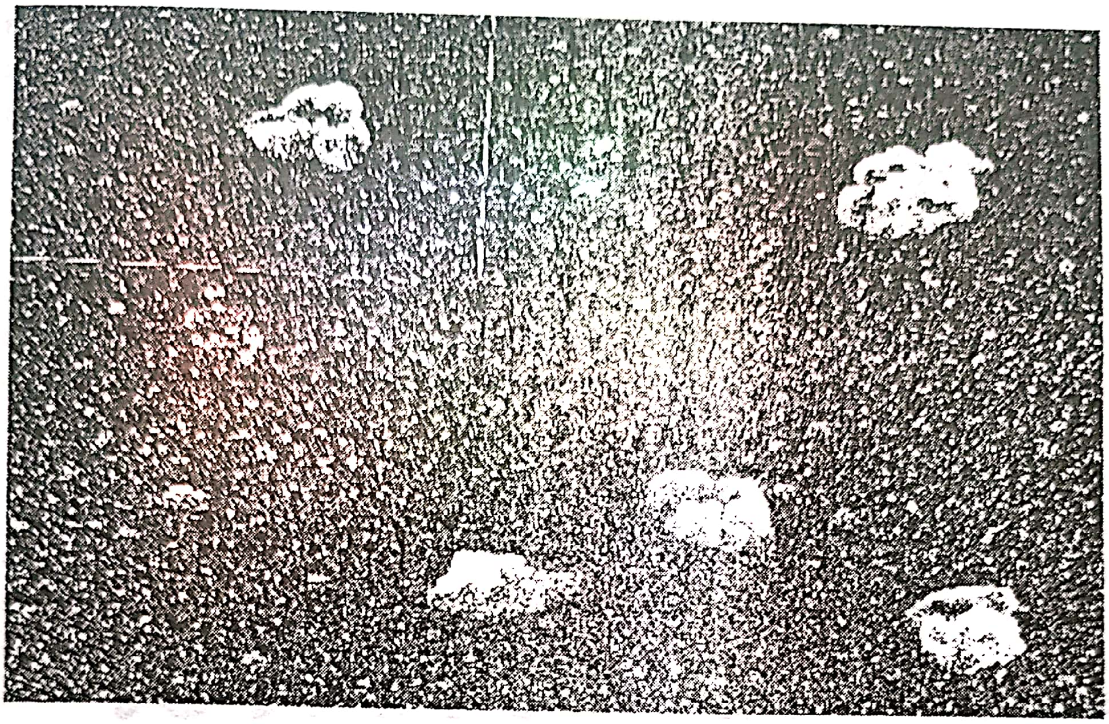


Fig. 11 — Imaginea electronomicroscopică a spliceosomilor (după Reed și colab., 1988).

Aceste snRNP implicate în asamblarea spliceosomilor cu ARN U1, U2, U5 și U4/U6 conțin un set comun de 7 proteine care au primit diferite simboluri (B, B', D, D', E, F, G, A, C, etc.). Tipuri distinctive de snRNP care conțin U1, U2 și U5 conțin proteine de tip special.

Descoperirea că secvența de nucleotide de la capătul 5' al ARN U1 este complementară secvenței consens, de la toate situsurile de splicing 5' ale intronilor, a reprezentat prima dovadă că *RNP este implicat în mecanismul de splicing*. Ulterior, s-a constatat că U1 snRNP se leagă în mod specific la joncțiunea de splicing 5' în vitro, unde protejează o secvență de aproximativ 17 nucleotide, la situsul de splicing 5' față de digestia cu RN-ază. U2 snRNP se leagă și protejează o regiune de 40 de nucleotide care conține nucleotidul A, implicat în formarea structurii lariate (ramificate). Legarea U2 snRNP la această regiune are la bază complementaritatea dintre terminalul 5' al U2 ARN și secvența intronică, realizând împerecherea pe o distanță de 15 nucleotide, la capătul 3' al intronului. Legarea snRNP, având ARN U2 și U5 la secvențele țintă corespunzătoare necesită proteine adiționale. Proteina AF se leagă la joncțiunea 3' a intronului (traiect AG și bogat în pirimidină) și facilitează legarea U2 snRNP în apropiere. Interacțiunile proteină-proteină și proteină-ARN joacă roluri diferite în formarea acestor complexe.

Asamblarea spliceosomului se face în cadrul procesului de splicing, acest proces realizându-se în interiorul unui asemenea ansamblu. Spliceosomii sunt particule de forma elipsoidală, ale căror dimensiuni variază între 25 şi 50 mm (fig. 11). În interiorul spliceosomului, intronul este asociat cu unul dinte snRNP-urile U1, U2, U4/U6 şi U5. Spliceosomii funcţionali conţin, de asemenea, alte proteine, în particular cele implicate în legarea snRNP-urilor la situsurile ţintă sau sunt în mod normal legate la pre-ARNm nuclear. U1 snRNP este primul care se leagă la joncţiunea de splicing, indiferent de existenţa situsurilor de legare funcţională U2 snRNP şi U5 RNP (fig. 12). Legarea nu este însă suficientă pentru a promova

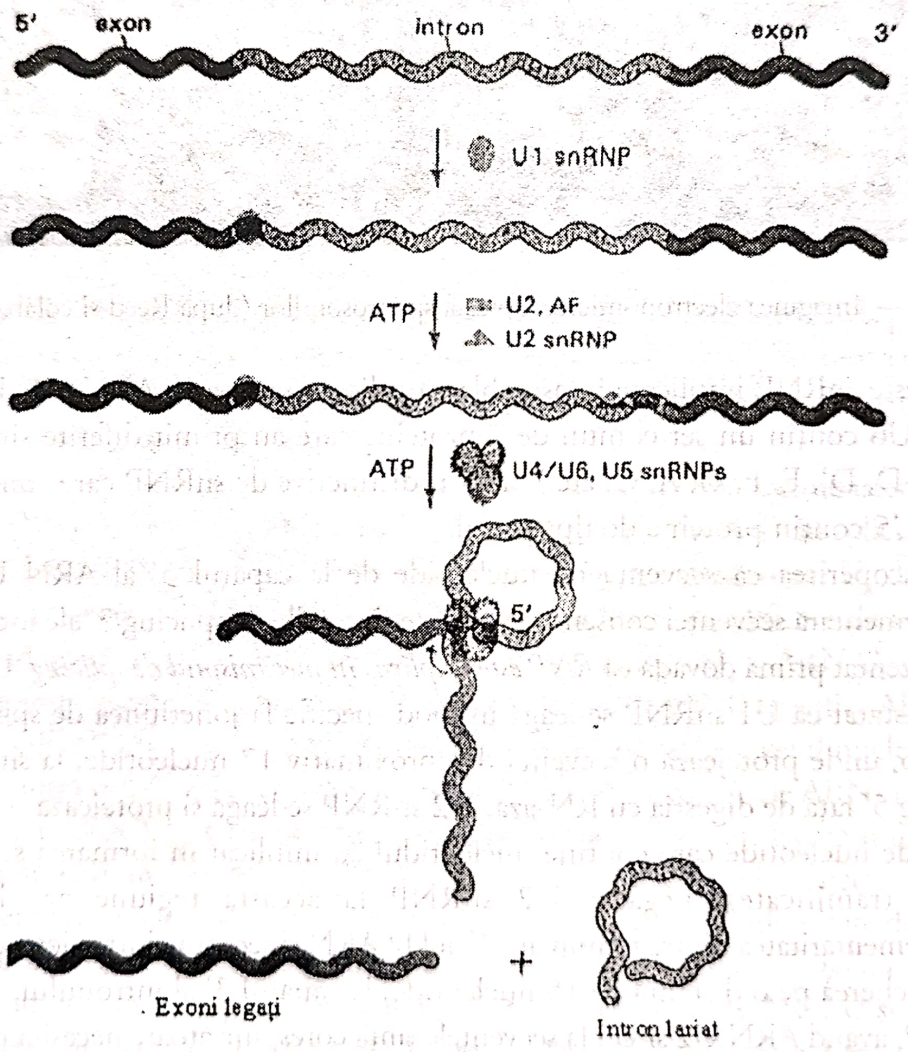


Fig. 12 — Asamblarea ordonată a spliceosomilor în cazul splicing-ului pre-ARNm (din Singer şi Berg, 1991).

clivajul ulterior, la situsul de splicing 5’. Asocierea complexelor U2, U5 și U4/U6 snRNP se realizează succesiv și necesită ATP, realizându-se pe bază de împerecheri complementare cu secvențe intronice, în cazul U2, și pe bază de interacțiuni dintre snRNP-uri, ca în cazul complexului care conține U4/U6 și U5 snRNP. Soarta spliceosomului, după ligația exonului nu este cunoscută, dar snRNP-urile individuale sau subansambluri sunt probabil reciclate și utilizate în prelucrările altor introni, pe când intronul ARN este degradat. Mai trebuie evidențiat mecanismul modalității de clivare a situsului de splicing 3’ și al ligației altor doi exoni.

Rezultatul final al splicing-ului intronului de grup II și al intronilor pre-ARNm este excizia intronului ca structură lariată și reunirea celor doi exoni flancatori.

Chimia acestor două procese este similara: un grup 2’-OH din interiorul intronului servește ca agent de atac nucleofil care promovează clivarea la situsul de splicing 5’ și grupul 3’-OH al exonului din amonte este nucleofilul care clivează situsul de splicing 3’ cu formarea unei punți fosfodiesterice exon-exon. Singura diferență constă în aceea că cel puțin intronii de grupa II sunt autoclivatori în vitro, pe când splicing-ul preARNm necesită o mașinărie complexă în a cărei componentă intră multiple tipuri de snRNP și proteine accesorii. Dar și unii introni de grup II necesită maturaze pentru splicing in vivo, deși pare probabil că atât nucleotidele cât și centrii catalitici implicați în splicing-ul autocatalitic și în cel asistat de maturaze sunt aceleași. Admițând că splicing-ul autocatalitic necesită o structură ARN pliată într-un mod înalt specific, este posibil ca maturazele să fie cele care pliază și stabilizează structura ce suferă transesterificările corecte, secvențiale.

Astfel, *singura diferență în reacțiile mediate de maturaze față de cele autocatalitice, din cadrul procesului de splicing, este aceea a modului în care intronii dobândesc conformația activă, din punct de vedere catalitic.*

Aceleași considerații sunt valabile pentru splicing-ul mediat de spliceosom. Probabil **snRNP**-urile și factorii asociați creează un „**scaffold**“ pe care intronul poate fi pliat în mod corespunzător, astfel că joncțiunile intronice și restul de la nivelul punctului de ramificație sunt juxtapuse și activate. În acest sens, implicarea spliceosomului în splicing-ul pre-ARNm nuclear este analog cu aceea a maturazelor pentru splicing-ul unor introni de grupa II.

Este improbabil ca doar o singură proteină să fie capabilă să plieze toți intronii, într-o formă autoreactivă. Totuși snRNP-uri înalt conservate care pot realiza împerecheri de baze cu doar două sau trei secvențe conservate, în toți intronii și se asociază una cu alta prin interacțiuni pe calea snRNP, pot fi capabile de a plia orice intron, într-o astfel de conformație, care să favorizeze transesterificările catalizate ale celor două ARN.

2.9. Transplicing

Transsplicing-ul este un tip de splicing care diferă de cel intramolecular care implică reacții de tip **cis**. În transsplicing au loc reacții intermoleculare de tip **trans** (fig. 13). Se pune întrebarea dacă doi exoni localizați în molecule separate de ARN pot fi uniți, cu eliminarea concomitentă a intronilor care îi flanchează. Acest tip de splicing intermolecular a fost realmente dovedit în experiențe in vitro, în care s-au utilizat molecule de ARN special desemnate. Dar, transsplicing-ul a fost evidențiat ca reprezentând o etapă esențială în producerea tuturor tipurilor de ARNm din celula de *Trypanasoma*, precum și în prelucrările post-transcripționale ale ARNm pentru 3 sau 4 gene ale actinei de la *Caenorhabdites elegans*. În fiecare caz, situsurile de splicing sunt de tip canonic și anume GU, la joncțiunea 5', și AG, la joncțiunea 3'. În plus, produsul transsplicing-ului este o structură ramificată. În cazul ARNm pentru actină, boneta și primele 22 de nucleotide de la terminalul 5' al acestor molecule specifice pentru actina musculară derivă din terminalul 5' al ARN, lung de 100 de nucleotide, transcris pe secvențe repetitive ADN de 5S, care au diferite localizări cromozomale.

Cel mai bun exemplu de **transsplicing celular** *este reprezentat de formarea ARNm-urilor de Trypanosoma*. Toate moleculele de ARNm de *Trypanosoma* conțin o secvență identică, netradusă, de 35 de nucleotide, la capătul 5', secvență care precede o secvență codificatoare neîntreruptă. Acești miniexoni 5' derivă dintr-un sector terminal 5' al moleculei de ARN de 137 nucleotide care este transcris de pe sutele de copii în tandem ale unui segment ADN corespunzând la 137 perechi de nucleotide din genom. *Transsplicing-ul reunește miniexonul 5' de 35 de nucleotide de la o moleculă de ARN, la exonul codificator de proteină al altei molecule de ARN*. Se formează, mai întâi, o moleculă ramificată de ARN, prin reunirea a doi introni. În etapa următoare, situsul de splicing 3' este clivat și cei doi exoni sunt reuniți. Segmentul ramificat, care conține secvențele „intronice" din două molecule separate de ARN, este apoi clivat sub acțiunea unei enzime de deramificare, având loc separarea intronilor care fuseseră prezenți în cele două molecule de ARN. Este important de notat că secvența aflată imediat în aval de miniexonul de la *Trypanosoma* este conformă unei secvențe consens pentru secvența situsului de splicing 5' și anume GUAUG.

În al doilea rând, joncțiunea intronică, asociată cu exonul codificator, este analogă secvențelor de la situsurile de splicing 3' ([C/U]$_n$NNAG).

În sfârșit, un nucleotid intronic oferă punctul de ramificație, sugerând că mecanismele de splicing de tip cis și de tip trans sunt analoge. Rămâne însă misterul modalității prin care este realizat un complex de splicing din două ARN-uri separate.

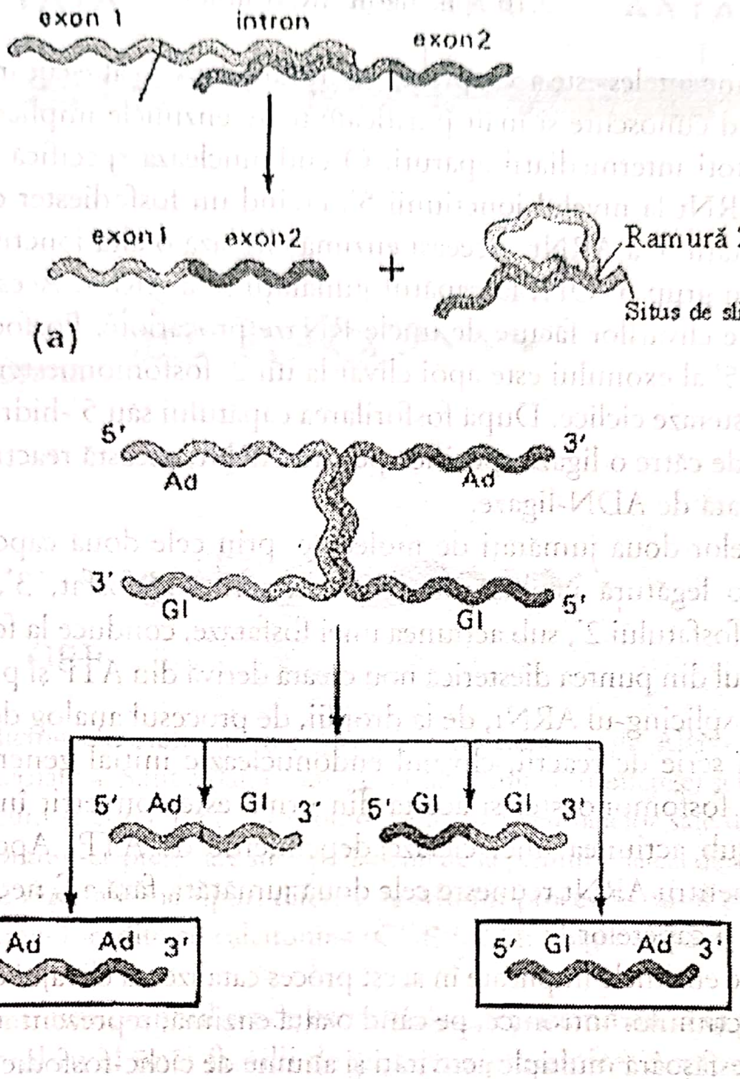


Fig. 11 — *Transsplicing*-ul ARNm, in vitro.

a) splicing dintre exoni localizați în molecule diferite de ARN testat într-un extract care catalizează splicing-ul pre-ARNm. O moleculă de ARN conține un exon și un intron legați printr-un situs de splicing 5'. Cealaltă moleculă de ARN constă dintr-un exon și dintr-un intron legați printr-un situs de splicing 3'. Secvențele complementare din cei doi introni mențin împreună cele două molecule de ARN. Intronii excizați au o structură lariată modificată.

b) Două molecule separate de ARNm ai căror introni sunt complementari pe o mare parte a lungimii lor și au fost folosiți ca substraturi pentru splicing-ul in vitro. Ad se referă la secvențele exonice 5' și 3' din două ARNm-uri de adenovirus, iar G1 se referă la secvențele exonice din ARNm pentru globină. În partea de jos se redau patru produși posibili de splicing, doi realizați prin **transsplicing** și alți doi prin **cissplicing**, dreptunghiurile cuprinzând produși predominanți de splicing (din Singer și Berg, 1991).

2.10 Splicing-ul ARNt-urilor

Cel mai bine înțeles este acest proces la drojdii, dar și la alte eucariote inferioare și plante, fiind cunoscute și înalt purificate toate enzimele implicate și totodată caracterizați toți intermediarii apăruți. O endonuclează specifică pentru ARNt clivează preARNt la nivelul joncțiunii 5', creind un fosfodiester ciclic 2', 3', la capătul jumătății 5' a ARNt. Aceeași enzimă clivează o altă joncțiune intronică, producând un grup 5'-OH, la capătul jumătății 3' a ARNt. Aceste clivări sunt reminiscențele clivărilor făcute de unele RNaze procariote. Fosfodiesterul ciclic de la capătul 5' al exonului este apoi clivat la un 2' fosfomonoester, sub acțiunea unei fosfodiesteraze ciclice. După fosforilarea capătului său 5'-hidroxil, exonul 3' este adenilat de către o ligază specifică pentru ARNt, această reacție fiind aceeași cu cea catalizată de ADN-ligaze.

Legarea celor două jumătăți de molecule, prin cele două capete activate ale lor, creează o legătură neobișnuită, fosfodiesterică 2'-fosfat, 3',5'fosfodiester. Îndepărtarea fosfatului 2', sub acțiunea unei fosfataze, conduce la formarea ARNt matur. Fosfatul din puntea diesterică nou creată derivă din ATP și prin acest aspect se deosebește splicing-ul ARNt, de la drojdii, de procesul analog de la vertebrate.

În această serie de reacții, clivajul endonucleazic inițial generează capete 5' hidroxil și 3' fosfomonoester și acesta din urmă este convertit în fosfodiesterul 2',3' ciclic, sub acțiunea unei ciclaze dependente de ATP. Apoi, o ligază cu specificitate pentru ARNt reunește cele două jumătăți, fără a fi necesară activarea suplimentară a capetelor.

Una dintre enzimele implicate în acest proces catalizează clivajul endonucleolitic la nivelul joncțiunilor intronice, pe când o altă enzimă, reprezentată de un singur polipeptid, desfășoară multiple activități și anume de ciclic-fosfodiesterază, kinază, de adenilare și de ligare. Aceste două enzime acționează nediscriminatoriu asupra oricăror introni din ARNt și reunesc oricare două segmente de ARNt.

2.11. Splicing-ul alternativ generează ARNm-uri pentru numeroase proteine codificate în aceeași genă.

Majoritatea moleculelor precursoare de ARNm sunt supuse splicing-ului pe o cale prin care este excizat fiecare intron, la nivelul situsurilor sale de splicing 5' și 3'. În consecință, fiecare din exonii transcriptului este păstrat în poziția sa inițială, ca o secvență continuă, într-un singur ARNm matur. Acest tip de splicing poartă numele de **splicing constitutiv.** Există însă și unele tipuri de preARNm care sunt supuse unui **splicing diferențiat**, generând o familie de ARNm-uri înrudite

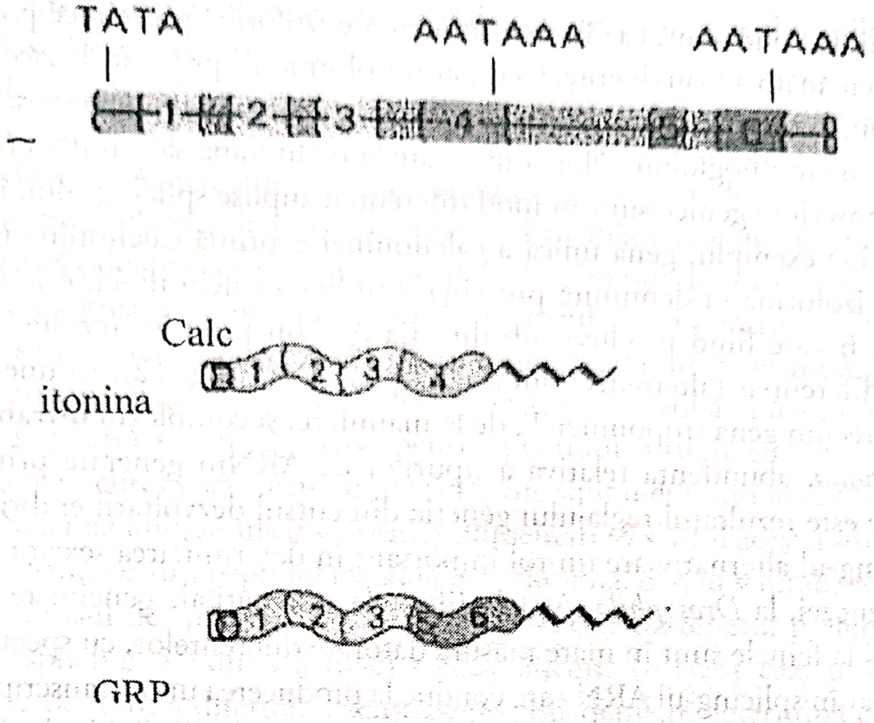


Fig. 12 — Splicing alternativ al unei molecule precursoare de ARNm cu capete de poliadenilare alternativă. Sunt redați exonii genei calcitoninei (numerele) și intronii acesteia (punctați), precum și cutia TATA a promotorului și a semnalelor sale de poliadenilare (AATAAA). Din transcriptele care sunt poliadenilate la primul și la cel de al doilea semnal de poliadenilare rezultă două tipuri diferite de ARNm procesate, unul purtând mesajul genetic al proteinei înrudite cu calcitonina (CGRP) (din Singer și Berg, 1991).

structural, fiecare având un subset de exoni și fiecare purtând mesajul genetic pentru un anumit membru al unei familii de izoforme proteinice. Acest tip de splicing se numește **splicing alternativ**. Acest tip de splicing alternativ este întâlnit de la *Drosophila,* la specia umană, precum și la virusurile care sunt reproduse în celulele gazdă. Printre genele care își maturizează moleculele lor de preARNm, adoptând calea splicing-ului alternativ, se numără cele implicate în dirijarea sintezei componentelor citoscheletului, musculaturii, receptorilor membranari, hormonilor peptidici, metabolismul intermediar și transpoziția ADN.

Fără a fi modificată organizarea genomică, splicing-ul alternativ oferă posibilitatea diversificării produselor informației ereditare înscrisă într-o singură genă. Splicing-ul alternativ reprezintă o cale eficientă prin care se generează o varietate de ARNm-uri purtătoare de mesaje genetice pentru proteine înrudite structural în care secvențele comune de aminoacizi sunt specificate de exonii comuni, pe când secvențele diferențiatoare de aminoacizi derivă din exonii supuși splicing-ului alternativ. În unele cazuri, ARNm-urile supuse splicing-ului alternativ sunt produse concurent, caz în care numeroase izoforme proteinice pot exercita funcții asemănătoare sau diferite. Cele patru izoforme ale proteinei bazice mielinice sunt componente deopotrivă ale tecilor de mielină ale sistemului nervos, cele două izoforme ale imunoglobulinelor sunt legate la membrană sau sunt secretate, etc. Unele transcripte genice sunt în mod diferențiat supuse splicing-ului, în diferite țesuturi. De exemplu, gena unică a calcitoninei exprimă calcitonina în tiroidă, pe când, izoforma sa denumită proteina înrudită a calcitoninei, este exprimată în creier, fiecare fiind produsă sub direcția ARNm propriu, rezultat printr-un splicing diferențiat (alternativ) din același preARNm (fig. 12). În unele sisteme genice, precum gena troponinei T, de la mamifere, și complexul **ultrabitorax** de la *Drosophila*, abundența relativă a tipurilor de ARNm generate prin splicing alternativ este rezultatul reglajului genetic din cursul dezvoltării embrionare.

Splicing-ul alternativ are un rol important în determinarea sexelor, în cursul embriogenezei, la *Drosophila*. Astfel, diferitele activități ale genelor reglatoare la masculi și la femele sunt în mare măsură datorate diferențelor, cu specificitate de sex, ce apar în splicing-ul ARN care conduc la producerea unor transcripte diferite funcțional, la cele două sexe. În plus, activitatea genelor individuale din această ierarhie reglatoare nu numai că se controlează prin ea însăși, la nivelul procesului de splicing, dar specifică chiar și pattern-ul de splicing al transcriptelor care funcționează ulterior în această ierarhie.

2.12. Pattern-uri de splicing alternativ

Există trei pattern-uri generale de splicing alternativ, desemnate tip I, tip II și tip III. Tipul I rezultă din utilizarea de promotori diferiți în geneza unor preARNm-uri înrudite, dar care au regiuni proximale 5' diferite, care variază ca lungime. Genele pentru a-amilaza de șoarece și pentru catena ușoară a miozinei (MLC) vertebratelor sunt tipice pentru acest splicing tip I. Gena MLC este transcrisă din doi promotori aflați la o distanță de 10Kb unul față de celălalt. ARNm precursor mai mare conține toți exonii, pe când cel scurt este lipsit de primul exon. Splicing-ul alternativ generează două ARNm-uri noi, egale ca lungime, fiecare conținând primii 5 exoni 3' proximali, constitutivi, dar fiind diferiți, după exonii lor 5'. În cursul splicing-ului preARNm mai lung, exonul 1 este unit cu exonul 4, fiind ignorate situsurile de splicing 3' ale exonilor 2 și 3. Dimpotrivă, în cursul splicing-ului preARNm mai scurt sunt sudați exonii 2, 3 și 5, neavând loc splicing-ul între exonii 3 și 4. Analiza secvenței a arătat că situsul de splicing 3' care flanchează exonul 2 este deficient, ceea ce explică eșecul reunirii exonului 1 cu exonul 2. Nu aceeași explicație este valabilă însă în cazul eșecului splicing-ului exonilor 1 și 3 și al exonilor 3 și 4.

Al doilea tip de splicing alternativ implică preARNm cu secvențe proximal 3' diferite și variabile ca lungime, ca urmare a faptului că transcriptul este poliadenilat în locuri diferite. Astfel, sunt generate cinci grupe diferite de ARNm târziu de adenovirus, prin splicing alternativ, datorită poliadenilării în cinci situsuri diferite. Tot pe această cale, pot rezulta două specii de ARNm purtătoare de mesaj genetic pentru catena grea a imunoglobulinei. Și în cazul genei pentru calcitonină de mamifere sunt generate două ARNm-uri: unul rezultă dintr-un preARNm mai scurt și poartă mesaj genetic pentru calcitonină, celălalt rezultă dintr-un preARNm mai lung și poartă mesajul genetic pentru peptidul înrudit cu calcitonina. În preARNm mai scurt există patru exoni (1-4), care sunt menținuți în ARNm matur. În preARNm mai lung se află doi exoni suplimentari (5 și 6) și aceștia sunt reținuți în ARNm matur pentru peptidul înrudit cu calcitonina, dar, în schimb, este pierdut exonul 4. Situsul de splicing 3', din intronul 4, este partenerul preferat pentru situsul de splicing 5', din cel de-al treilea intron. În acest caz, utilizarea cu specificitate de țesut a diferitelor semnale de poliadenilare determină care tip de splicing este realizat.

În cadrul celui de al treilea tip de splicing alternativ, preARNm-uri identice generează diferite tipuri funcționale de ARNm. Toți exonii potențiali sunt prezenți în preARNm și selecțiile de splicing se fac între exonii existenți. În cazul multor gene se utilizează modelele a și b de splicing, gena troponinei T, din musculatura scheletică, fiind un exemplu tipic în acest sens. Grupele a și b de ARNm pentru troponină T conțin, prima, exonul 16, cea de a doua, exonul 17, ceea ce rezultă din splicing-ul reciproc exclusiv al exonilor 15, 16 și 18 sau 15, 17 și 18. Alegerea exonului este reglată în cursul dezvoltării.

Exonul 16 este specific ARNm purtător de mesaj genetic pentru troponină T, în mușchiul adult, pe când exonul 17 este utilizat atât în ARNm adult cât și în ARNm embrionar.

Fiecare din cele 32 tipuri alternative, combinatorice de splicing, în care sunt implicați exonii de la 4 la 8 sunt reprezentați de grupele α și β, modelele variind de la excluderea completă la reținerea tuturor acestor cinci exoni în ARNm matur.

Se remarcă și posibilitatea ca splicing-ul să implice situsurile de splicing 5' la 3' din interiorul exonilor sau al intronilor. Astfel, deși un situs de splicing autentic 5' realizează splicing-ul, la nivelul situsului normal de splicing 3', de la capătul aceluiași intron, acesta poate folosi un situs alternativ 3' de splicing, din interiorul intronului, ceea ce conduce la alungirea următorului exon. Utilizarea unui situs alternativ 3' de splicing, din următorul exon, conduce la trunchierea acelui exon. Rezultate similare apar atunci când sunt utilizate situsuri alternative 5' de splicing, din interiorul exonilor sau al intronilor. Aceste situsuri alternative de splicing se numesc **joncțiuni „criptice" de splicing**. Existența și utilizarea lor face posibilă realizarea de numeroase cadre de citire translaționale. Această situație este întâlnită în cazul splicing-ului alternativ de la virusurile SV40 și *Polyoma*, la care transcriptul unic al unei singure regiuni timpurii poate genera multiple tipuri de ARNm. Acest tip de splicing alternativ anulează, de fapt, distincția dintre posibilitățile de codificare ale intronilor și exonilor.

Un exemplu interesant de splicing alternativ, cu specificitate tisulară, este oferit de gena care codifică transpozaza elementului P, de la *Drosophila.* În acest caz, eșecul în splicing-ul unui intron, care conține un codon de terminare translațională, blochează expresia transpozazei în țesuturile somatice. Expresia transpozazei din linia germinală depinde de abilitatea țesutului de a realiza splicing-ul intronului, astfel putând avea loc extinderea cadrului de citire la nivelul unui exon necesar pentru activitatea transpozazei.

În expresia genică retrovirală apare un caz extrem de splicing diferențiat. Provirusul integrat este transcris într-o copie completă de ARN genomic viral, care în cele din urmă este împachetat în virion. În acest transcript primar ARN destinat să devină genom viral nu are loc splicing-ul. Dar, alte molecule ale aceluiași transcript primar, de lungime egală cu aceea a provirusului, funcționează ca ARNm care poartă mesajul genetic atât pentru proteinele miezului de acid nucleic virional, cât și pentru revers-transcriptază. Dar, totodată, același transcript reprezintă pre-ARNm care este supus splicing-ului, spre a da naștere la ARNm purtător de mesaj genetic pentru proteina anvelopei.

În cazul retrovirusurilor pentru leucemia umană cu celule T și imunodeficienței umane, se constată realizarea unor numeroase modalități de splicing al transcriptului primar, prin care sunt generate diferite tipuri de ARNm, fiecare purtând mesajul genetic pentru o anumită proteină implicată în multiplicarea virală sau în procesele patogenezei.

Principala enigmă a splicing-ului, fie el constitutiv, fie el alternativ, este în jurul modului în care sunt alese pentru reunire perechile corecte de joncțiuni exonice. Există explicații care invoca existența unor elemente structurale intrinseci în pre-ARNm sau a intermediarilor formați de-a lungul căii, spre realizarea unui ARNm complet, matur. Aceste elemente sunt reprezentate de factorii **cis**. Altă explicație implică factori **trans** activatori ai selecției situsului de splicing, reprezentați de proteine sau alte molecule de ARN care influențează alegerea intronilor ce vor fi supuși splicing-ului. Există în mod cert o ierarhie a activităților eficiente în splicing, care reflectă avantajul celor mai favorizate situsuri de splicing 5' și 3', în cursul formării spliceosom-ului.

În cazul splicing-ului celor două tipuri de ARNm ce poartă mesajul genetic pentru antigenul T de SV40, cele două reacții de splicing alternativ sunt determinate de alegerea punctelor de ramificare în intron. Există mai multe exemple care atestă că mutațiile la nivelul unor joncțiuni de splicing permit ca să acționeze un alt situs în locul celui care a suferit mutația care, în condiții normale, nu este utilizat. Și factorii transactivatori din splicing controlează reacțiile de splicing, mai ales acolo unde acest proces depinde de condițiile fiziologice concrete sau de tipul de țesut. Tipuri speciale de snRNP sau proteine asemănătoare maturazei pot fi exprimate și pot funcționa de o manieră dependentă de tipul de țesut sau stadiul de dezvoltare, influențând modelul de splicing.

CAPITOLUL VIII

CODIFICAREA BIOCHIMICĂ — CODUL GENETIC

Sinteza fiecărei molecule proteinice dintr-o celulă este direcționată de ADN intracelular. Pentru a înțelege cum se realizează această direcționare se ridică două aspecte: problema informației sau a codificării și problema chimică. Informația ereditară asigură ca o secvență de baze azotate din ADN să fie tradusă într-o secvență de aminoacizi din catena polipeptidică.

Problema chimică se referă la procesul real de sinteză a proteinei, adică inițierea sintezei, unirea aminoacizilor într-o ordine corectă, terminarea catenei polipeptidice, eliberarea acesteia din aparatul de sinteză, plierea și modificarea catenei nou sintetizate.

Aspectul informațional împreună cu cel chimic al sintezei unei catene polipeptidice constituie elementele esențiale care definesc procesul de translație, adică de traducere genetică.

1. CODUL GENETIC UNIVERSAL

Prin cod genetic se înțelege o colecție de codoni (triplete de nucleotide), fiecare fiind alcătuit din câte trei nucleotide ce poziționează câte un aminoacid în catena polipeptidică, unele dintre ele definind și semnalele stop din traducerea genetică. În cadrul acestui proces, secvența de codoni din ARNm este convertită (tradusă) într-o secvență de aminoacizi, cu sinteza catenei polipeptidice specifice mesajului genetic purtat.

Deoarece există 20 de aminoacizi comuni în catenele polipeptidice, trebuie să existe mai mult de 20 de codoni care să includă și semnale pentru inițierea și stoparea sintezei diferitelor catene polipeptidice. De vreme ce fiecare codon conține trei baze azotate, din combinația a câte trei din cele patru baze azotate distincte, rezultă relația $4^3=64$. Aceste 64 de combinații asigură codificarea tuturor celor

20 de aminoacizi, existând chiar redundanță informațională, același aminoacid putând fi codificat de mai mulți codoni.

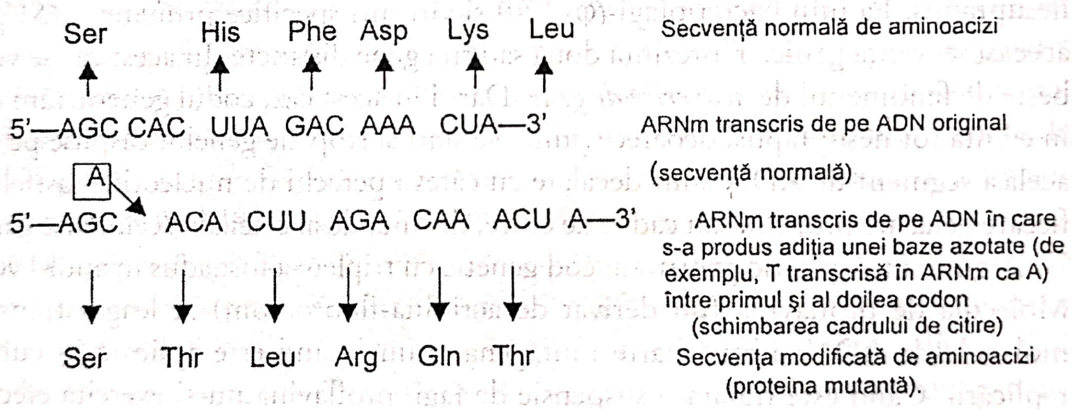
Informația ereditară este înscrisă în secvența de baze azotate din ADN, la toate sistemele biologice, sau din ARN viral, la ribovirusuri, sub forma de codificare biochimică, aceasta reprezentând modul cum se succed bazele azotate în secvența de nucleotide a ADN, mod care este caracteristic fiecărei specii. Acesta este CODUL GENETIC INFORMAȚIONAL. El este transmis, perpetuat si conservat prin replicare, de-a lungul generațiilor unei specii. Fiecare specie, utilizând același mod de codificare a informației ereditare, reprezentat de înșiruirea celor patru tipuri distincte de baze azotate, dar într-o manieră cu specificitate de specie, are propriul său cod genetic informațional. Bazele azotate conferă specificitatea informațională a codului genetic, celelalte elemente ale nucleotidelor fiind absolut identice la toate speciile. Codul genetic informațional poate fi modificat prin mutație, apărând noi codoni informaționali. Există însă și un COD GENETIC OPERAȚIONAL care folosește același sistem de înscriere de informații, mai exact de mesaje genetice — secvența de baze azotate, de această dată însă, în ARNm. Acest cod genetic operațional este realizat prin transcrierea genetică a codului genetic informațional, pe principiul complementarității, pe unități de transcriere (cistroni sau gene, respectiv operoni). Nefiind depozitar de informație ereditară, precum este codul genetic informațional din ADN, respectiv ARN viral, ci doar depozitar de mesaj genetic — secvența de codoni din ARNm — codul genetic operațional nu are atributul perenității, nu este transmisibil in descendență, funcționând doar temporal, spre a îndeplini realizarea instrucțiunilor dictate de codul genetic informațional, prin stabilirea secvenței de aminoacizi a catenelor polipeptidice, sintetizate la nivelul ribozomilor, sub direcția sa.

Dacă fiecare specie are propriul său cod genetic informațional (secvența de baze azotate din ADN), existând atâtea coduri genetice informaționale câte specii distincte există în natură, codul genetic operațional este universal, adică același la toate speciile biologice. Semnificația de codificare a codonilor din codul genetic operțional nu se modifică prin mutageneză. Cu alte cuvinte, prin mutație nu apar codoni noi, în sens funcțional, nu se schimbă semnificația lor în codificarea pentru diferiți aminoacizi, chiar dacă se modifică secvența codonilor în ARNm, în urma mutației din ADN. Mutația la nivelul ADN (la nivelul codului genetic informațional) are drept consecință modificarea secvenței de baze azotate și deci a informației ereditare. Aceasta va duce la modificarea secvenței de codoni, dar nu la apariția de codoni cu altă semnificație de codificare, distincți de cele 64 de triplete care alcătuiesc vocabularul codificării biochimice din sistemele biologice. Chiar dacă in procesul de transcriere se modifică secvența de baze azotate a ARNm, această modificare duce la apariția unei alte secvențe de codoni în ARNm, dar nu crează codoni noi, distincți de cei 64 de codoni, îndeobște cunoscuți. Mutația poate transforma un codon în altul din cadrul celor 64 de codoni ai codului genetic operațional, dar nu conduce la apariția de noi codoni, alții decât cei ai codului genetic „clasic".

Codul genetic ar putea fi suprapus, adică acoperit, sau nesuprapus, adică neacoperit. Intr-un cod genetic suprapus, fiecare bază azotată a unui codon servește ca bază azotată a unui alt codon învecinat. Intr-un cod genetic nesuprapus, fiecare bază a unui codon, este utilizată numai în constituirea acelui codon. Un cod genetic suprapus ar avea avantajul economiei, deoarece, o regiune anumită a macromoleculei ADN ar putea purta informația genetică pentru sinteza unui număr de trei ori mai mare de tipuri diferite de proteine, față de un cod genetic nesuprapus. Totuși, un cod genetic suprapus ar avea un mare dezavantaj și anume acela că modificarea prin mutageneză a unei singure baze azotate ar afecta în același timp nu unul (ca în codul genetic nesuprapus), ci trei aminoacizi. Efectul biologic al unui cod genetic suprapus ar fi dezastruos, deoarece mutația aparută ar avea cu mare probabilitate efect letal. Examinându-se secvența de aminoacizi a proteinelor de tip sălbatic și de tip mutant, a căror sinteză este dirijată de o anumită genă virală, s-a constatat că mutația punctiformă (genică) alterează un singur aminoacid, nu trei, de unde s-a tras concluzia că, într-adevar, codul genetic este neacoperit, nesuprapus. La unii bacteriofagi (*φx174*) și virusuri specifice primatelor (SV_{40}), aceeași secvență genică reprezintă două sau trei gene distincte. In acest caz se vorbește de fenomenul de *acoperire de gene*. Dar și în acest caz, codul genetic rămâne în esență tot nesuprapus, deoarece punctele start și stop ale genelor dispuse pe un același segment de ADN sunt decalate cu câteva perechi de nucleotide, astfel că fiecare genă are propriul său cadru de citire, distinct de al celeilalte/celorlalte gene.

Argumentul genetic pentru un cod genetic cu triplete a fost adus in anul 1961. Molecula de proflavină (un derivat de acridină-fluorocrom) se leagă strâns la molecula de ADN și este foarte mutagenă, atunci când este aplicată în cursul replicării. Când este tratată o suspensie de fagi, proflavina nu-și exercită efectul mutagen asupra acestora dar, atunci când este tratată o cultură de bacterii, infectată cu fagi, proflavina își exercită efectul său mutagen și asupra bacteriofagilor.

Mutantele induse cu acridină au o proprietate prin care se disting de alte tipuri de mutante și anume ele nu pot suferi reversie spre tipul sălbatic, atunci când sunt supuse unui tratament cu mutageni, al căror efect este substituția de baze. S-a crezut că ele sunt reprezentate de deleții, dar această concluzie a fost exclusă, atunci când s-a obținut totuși o reversie spre tipul sălbatic, prin tratarea unei asemenea mutante indusă de acridină, tot cu mutageni acridinici. Era prea improbabil ca să fie restaurată secvența de baze azotate a tipului sălbatic (normal) la descendența mutantei, prin mutageneză suplimentară, așa că s-a tras concluzia că asemenea revertanți la tipul sălbatic erau tot mutante produse prin aceeași acțiune a acridinelor, reprezentând de fapt un nou tip de mutante. Acestea erau mutații ale mutantelor. Cheia înțelegerii naturii lor a fost găsită prin constatarea că ele apar numai dacă fagul se replică în prezența unei substanțe considerată a fi agent de intercalare în duplexul ADN. Explicația genezei acestor mutații constă în faptul că o moleculă de acridină se intercalează în duplexul ADN și deplasează două baze adiacente prin îngroșarea celei cu care se asociază și în consecință, în cursul replicării, are loc eventual inserția unei baze suplimentare, atunci când ADN polimeraza întâlnește o moleculă deja intercalată. Mutantele induse de acridine sunt de fapt mutante de *adiție de baze azotate.* Apariția unei baze azotate în secvența codificatoare are clar efect mutagen, de vreme ce, prin aceasta alterează faza sau cadrul de citire a codului genetic, pentru o proteină specifică. Consecința este că în traducerea mesajului genetic, fiecare aminoacid, în avalul punctului de adiție a bazei, la nivelul ADN, transcrisă în ARNm, va fi diferit. S-a dedus că reversia unei mutante indusă de acridină nu poate avea loc decât în condițiile în care, acționând o altă moleculă de acridină, se determină deleția unei baze azotate. Analiza unei colecții de mutante induse de acridină în regiunea *rIIA* a fagului T_4 de *E. coli* a condus la următoarea schemă:


Ser His Phe Asp Lys Leu
Secvență normală de aminoacizi
5'—AGC CAC UUA GAC AAA CUA—3'
ARNm transcris de pe ADN original (secvență normală)
A
5'—AGC ACA CUU AGA CAA ACU A—3'
ARNm transcris de pe ADN în care s-a produs adiția unei baze azotate (de exemplu, T transcrisă în ARNm ca A) între primul și al doilea codon (schimbarea cadrului de citire)
Ser Thr Leu Arg Gln Thr
Secvența modificată de aminoacizi (proteina mutantă).

Adiția unei singure baze azotate la nivelul unui segment în ADN schimbă întreaga secvență de codoni în ARNm transcris de pe acel segment și, în consecință, întreaga secvență de aminoacizi din catena polipeptidică,

Din punct de vedere genetic, gena *rIIA* din genomul fagului T_4 poate fi împărțită în cel puțin două regiuni, una nerelevantă, alta relevantă. Cea nerelevantă este definită de faptul că este foarte dificil să se obțină mutante de substituție de baze și de fapt ea poate fi deletată, fără pierderea deplină a funcției genice. Aceasta înseamnă că regiunea nerelevantă a proteinei *rIIA* poate tolera multe schimbări în secvența de aminoacizi, fără a deveni nefuncțională. Totuși, mutageneza provocată de proflavină duce la apariția multor mutante ale acestei regiuni nerelevante si asemenea mutații pot fi reversate cu mare frecvență, prin creșterea bacteriei în prezența acridinei. Mutantele induse cu acridine pot fi încadrate în două clase distincte, care au fost desemnate convențional (+) și (-). Aceste clase de mutante se disting prin următoarele:

- „încrucișarea“ (infecția mixtă a aceleiași culturi bacteriene care permite recombinarea dintre moleculele ADN ale mutantelor) dintre două mutante (+) nu conduce la apariția fagului de tip sălbatic;
- „încrucișarea“ dintre două mutante (-) nu conduce la apariția fagului de tip sălbatic;
- „încrucișarea“ dintre o mutantă (+) și una (-) conduce la apariția fagului de tip sălbatic. Interpretarea unei asemenea experiențe se poate face astfel: mutantele (+) au suferit mutații de adiție, pe când mutantele (-) au suferit mutații de deleție. Un dublu-mutant de tip (+) (+) sau (-) (-) are două baze adiționale, respectiv îi lipsește două baze. In ambele cazuri, cadrul de citire al codului va fi deplasat cu două baze față de ordinea normală, de la tipul sălbatic de fag și, în consecință, nu poate fi sintetizată o proteină funcțională. Totuși, un dublu-mutant (+) (-) va face ca, în urma adiției (+), cadrul de citire să progreseze, dar, în urma deleției (-), acest cadru de citire să revină la normal, fiind corectat. Intre cele două situsuri mutante (+) și (-), secvența de aminoacizi nu va fi, evident, normală, dar tulpinile fagice (+) (-) și (-) (+) vor fi funcționale, deoarece locii mutanți sunt localizați în regiunea nerelevantă. Cât timp cadrul de citire *(reading frame)* este restabilit înainte de regiunea relevantă, încă se poate produce o proteină funcțională.

Aceste experiențe au mai dovedit faptul că un dublu-mutant (+) (+) sau (-) (-) nu are restabilit niciodată cadrul normal de citire, ceea ce a permis să se tragă concluzia că nu poate funcționa un cod genetic organizat în dublete. Experimentul crucial în dovedirea realității codului genetic cu triplete a fost construirea unor triplu-mutanți. Cei de tip (+) (+) (+) și (-) (-) (-) au avut fenotipul sălbatic, pe când cei micști (+) (+) (-) și (+) (-) (-) erau tot mutanți.

Această experiență elegantă a dovedit realitatea codului genetic cu triplete. In experiențele ulterioare, s-a analizat gena pentru lizozim a fagului T_4. S-a stabilit secvența de aminoacizi a lizozimului, de la tipul sălbatic de fag și de la mutantele fagice induse cu acridine, având modificată o singură bază azotată. Intr-adevăr, s-a constatat că la asemenea mutante există un situs de la care toți aminoacizii sunt schimbați. S-a dovedit că multe mutante (-) erau de fapt dublu-mutante (+) (+), bazele azotate fiind adăugate una adiacent celeilalte.

2. ELUCIDAREA SECVENȚEI DE BAZE AZOTATE A CODONILOR

Descifrarea codonilor codului genetic a început în anul 1961, atunci când Marshall Nirenberg si Heinrich Mattei au incubat un amestec de ribozomi, molecule de ARNt, aminoacizi marcați radioactiv, o fracțiune celulară (de compoziție neprecizată, dar cunoscută a fi cerută de sinteza proteinică) și acidul poliribonucleotidic sintetizat artificial—*acidul poliuridilic* (**poli-U**). In amestecul respectiv, acelular, s-a putut constata că apare un polipeptid sintetic polifenilalanina. S-a dedus că *fenilalanina* este codificată de tripletul **UUU**. Variațiuni ale acestui experiment de bază au condus la identificarea tuturor codonilor care conțin U.

Prepararea lui poli-(U) și a altor polinucleotide sintetice se realizează prin incubarea ribonucleotid-difosfaților cu enzima polinucleotidfosforilază, într-o reacție în care nu este necesară o matriță. Dacă se adaugă doar UDP (uridină 5'-difosfat), va rezulta un poli-(U). Dacă se adaugă UDP și guanozină 5'-difosfat (GDP), rezultă polimeri cu U și G, poli-(UG). Secvența de baze a unor asemenea polimeri este, evident, randomizată, astfel că într-o colecție de polimeri micști este posibil să se calculeze frecvența de apariție a fiecărui codon.

Iată frecvența așteptată a tripletelor, într-un copolimer randomizat cu U (0,76) și G (0,24).

Tripletul	Probabilitatea	Frecvența relativă
UUU	76 X 76 X 76 = 439	100
UUG	76 X 76 X 24 = 139	31,6
UGU	76 X 24 X 76 = 139	31,6
GUU	24 X 76 X 76 = 139	31,6
UGG	76 X 24 X 24 = 0,438	10,0
GGU	24 X 24 X 76 = 0,438	10,0
GUG	24 X 76 X 24 = 0,438	10,0
UUU	24 X 24 X 24 = 0,138	3,1

Dacă acest amestec de polimeri este utilizat în 20 de determinări diferite, fiecare conținând toți cei 20 de aminoacizi, dintre care doar câte unul este de fiecare dată marcat radioactiv, poate fi determinată frecvența cu care fiecare aminoacid este inclus în moleculele polipeptidice, nou sintetizate.

Utilizând ca ARNm un copolimer randomic cu U (0,76) și G (0,24), s-a obținut următoarea încorporare de aminoacizi:

Aminoacidul	Cantitatea relativă încorporată	Compoziția dedusă a codonului
Fenilalanina	100	3U
Valina	37	2U, 1G
Leucina	36	2U, 1G
Cisteina	35	2U, 1G
Triptofan	14	1U, 2G
Glicina	12	1U, 2G

Dacă o singură guanină se adaugă la terminalul unui poli-(U) se constată că polifenilalanina se termină adesea cu leucina.Se deduce că pentru leucină codifică codonul UUG. Dacă mai multe guanine se adaugă la terminalul unui poli-(U), atunci polifenilalanina se termină cu glicină, ceea ce dovedește că GGG codifică pentru glicină. Cu frecvență mai mică, la capătul carboxil al polifenilalaninei, se întâlnesc leucină și triptofan, de unde s-a dedus că la punctul de tranziție de la U la G se pot forma codonii UUG și UGG care codifică pentru cei doi aminoacizi.

Experiențe similare s-au realizat cu polimeri micști (copolimeri) — U cu A și U cu C, adică poli-(U, A) și poli-(U, C), spre a se identifica ceilalți codoni ce conțin U. S-au studiat și alți homopolimeri, precum poli-(A) care determină formarea polilizinei, ceea ce arată că AAA codifică pentru lizină. Poli-(C) determină sinteza poliprolinei, pe când poli-(G) nu poate acționa ca ARNm sintetic, deoarece formează un helix tricatenar care nu poate fi tradus.

In perioada 1960-1964, Har Ghobind Khorana a reușit să sintetizeze o serie de ribopolimeri cu o secvență de perechi repetate precum copolimerul poli-(AC), adică ACACAC... Acest polimer va fi citit în grupe de trei, de tip ACA CAC ACA CAC ACA CAC, astfel că proteina sintetizată in vitro va fi cu o secvență alternativă de treonină și histidină:

Thr — His — Thr — His — Thr — His

Din alte experiențe, se știa că treonina are în codonul determinant 2A și 1C, pe când histidina are în codonul său 2C și 1A, astfel că s-a dedus corespondența codoni-aminoacizi: ACA codifică pentru treonină, pe când CAC codifică pentru histidină.

Experiențe similare, utilizând poli-(UG), adică UGUGUGUGUGUG, au evidențiat sinteza polipeptidului sintetic:

Cys — Val — Cys — Val — Cys — Val

De aici, s-a dedus că UGU codifică pentru Cisteină, iar GUG codifică pentru valină.

Khorana a realizat polimeri în care se repetau triplete de nucleotide. De exemplu, polimerul UACUACUACUACUAC poate fi citit și tradus în trei moduri:

UAC UAC UAC UAC UAC, determinând secvența: Tyr — Tyr — Tyr — Tyr –Tyr;

ACU ACU ACU ACU ACU ACU, determinând secvența: Thr — Thr — Thr — Thr — Thr — Thr, sau

CUA CUA CUA CUA CUA CUA CUA, determinând secvența: Leu — Leu — Leu — Leu — Leu — Leu — Leu.

In aceeași perioadă, M. Nirenberg și Philip Leder au descoperit că trinucleotidele sintetice stimulează legarea moleculelor de ARNt la ribozomi. De exemplu, dacă se realizează un amestec de ribozomi cu toate tipurile de ARNt la care sunt atașați aminoacizii marcați radioactiv,dar în care se introduce doar trinucleotidul UUU, după care sunt izolați ribozomii, s-a constatat că doar ARNt purtător al fenilalaninei se asociase cu ribozomii. Acest tip de experiment a fost efectuat pentru toate cele 64 de tipuri de codoni și pe această cale au fost confirmați definitiv, cu valoare de funcționare în codificare, 50 de codoni.

3. IDENTIFICAREA CODONILOR STOP

Identificarea codonilor stop s-a realizat tot prin utilizarea de ARN artificiali cu o secvență definită de ribonucleotide. De exemplu, cu polimerul poli-(UAUC), translația poate fi începută la oricare din cele patru situsuri, dar un singur tip de proteină este fabricată și anume aceea care conține secvența de aminoacizi repetată –Tyr — Leu — Ser — Ile -, catena polipeptidică începând cu oricare din cei patru aminoacizi. Această constatare susține semnificația presupusă a codonilor și dovedește că în acest sistem sintetic, translația poate începe la oricare situs pe un ARNm artificial.

Polimerul poli-(GUAA) dă un rezultat cu totul diferit. El poate fi citit:

GUA AGU AAG UAA GUA AGU AGG

Sau G UAA GUA AGU AAG UAA GUA AGU

Sau G U A A G U A A G U A A G U A A G U A A G U A
Sau A G U A A G U A A G U A A G U A A G U A A

S-a constatat că nu se sintetizează polipeptide mari. De fapt, s-au identificat doar două polipeptide, și anume: tripeptidul Val–Ser-Lys și dipeptidul Ser-Lys. Din semnificațiile stabilite ale codonilor GUA, pentru Valină, AGU, pentru Serină și AAG, pentru Lizină, s-a dedus că aceste peptide pot fi aliniate în patru cadre de citire diferite, după cum urmează:

1. GUA AGU AAG UAA G U A A G U A A G
....Val Ser Lys ?
2. G U A A GUA AGU AAG UAA GUA GUA
Val Ser Lys ?
3. G U A A G UAA GUA AGU AAG UAA GUA
Lys ?
4. AGU AAG UAA GUA AGU AAG UAA
Ser Lys ?

De notat că, în fiecare caz, sinteza se oprește exact înaintea unui codon UAA, ceea ce denotă că UAA trebuie să fie un **codon stop.** Ulterior, s-a dovedit că nu există nici un tip de ARNt care să se lege la UAA, ceea ce reprezintă motivul pentru care UAA funcționează în calitate de codon stop.

Experiențe similare au dovedit că polimerul poli-(AUAG) a determinat sinteza doar a unui tripeptid Ile–Asp–Arg și a unui dipeptid Asp–Arg, ceea ce a permis să se tragă concluzia că UAG este, de asemenea, un codon stop. Tot astfel, cu poli-(UGA) se poate sintetiza doar un polipeptid cu Metionină și doar un polipeptid cu Acid aspartic, dovedind că UGA este, de asemenea, un codon stop.

Ca un joc de laborator, celor trei codoni li s-au dat următoarele denumiri, care mai sunt încă utilizate în descrierile curente.

UAG — ambră
UAA — ocru
UGA — opal (azur)

Secvențierea ulterioară a ADN și a ARNm pentru proteinele a căror secvență de aminoacizi a putut fi în mod cert stabilită, a confirmat veridicitatea semnificației codonilor, stabilită pe căile arătate mai sus.

Tabelul codului genetic universal se prezintă astfel:

Prima poziție Terminal 5'	A doua poziție				A treia poziție Terminal 3'
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	Stop	Stop	A
	Leu	Ser	Stop	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

Redarea codului genetic poate fi realizată și pe cale grafică (fig. 1).

Există o convenție în redarea codonilor. Astfel, codonul de inițiere AUG este redat corect, potrivit acestei convenții, sub forma 5'-AUG-3'. In consecință, anticodonul din ARNt, care recunoaște acest codon inițiator, va avea orientare antiparalelă și va fi redat 5'-CAU-3' și nu UAC. In împerecherea codon-anticodon apar și alte perechi de baze, în afară de cele specifice de tip A-U, U-A, G-C și C-G.

In sistemele acelulare de sinteză proteinică, utilizate de Nirenberg, sinteza proteinică poate începe la oricare bază din polimerul sintetic, pe când „*in vivo*" — sinteza proteinică nu poate fi inițiată la nivelul oricărei baze din ARNm. Obligatoriu, „*in vivo*", sinteza proteinică este inițiată la nivelul unui **codon de inițiere** care a fost identificat a fi reprezentat de tripleta *AUG*. Rareori, în calitate de codon de inițiere, poate funcționa și tripleta *GUG*. Semnale speciale intervin în selectarea din secvența de codoni a unei macromolecule de ARNm, a codonului de inițiere AUG. In acel moment, al alegerii codonului de inițiere, este definit, adică este stabilit sau conturat și **CADRUL DE CITIRE** al mesajului genetic — *reading frame*. Dacă semnalul de inițiere nu este primit, atunci codonul AUG, aflat în interiorul cadrului de citire, este citit pur și simplu ca un codon intern

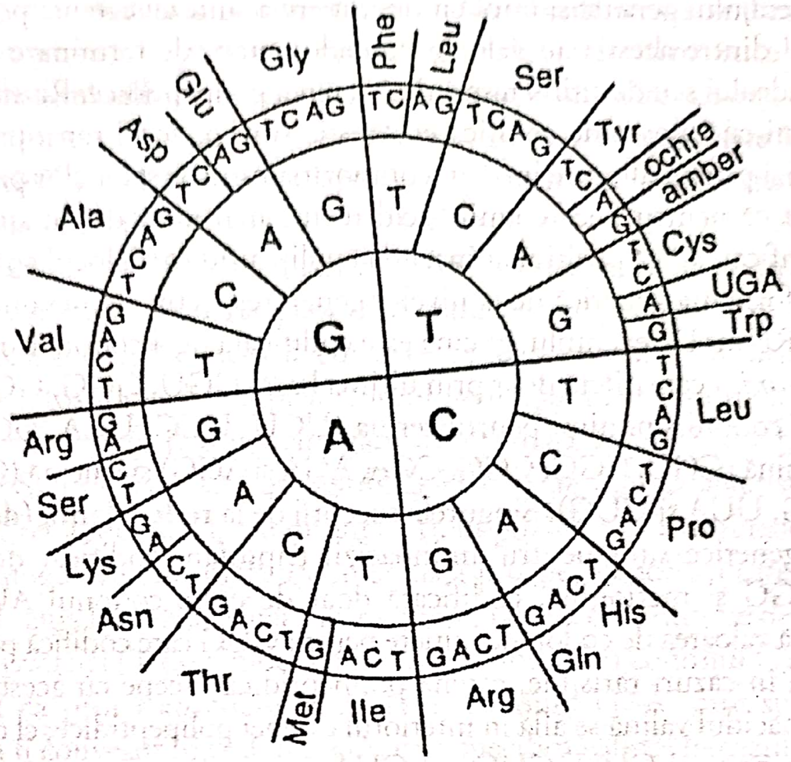


Fig. 1 — O altă modalitate de redare grafică a Codului genetic universal, în care, cu excepția codonului stop UGA, în toți ceilalți codoni, uracilul este înlocuit cu timina. Astfel, codonul de inițiere AUG, devine ATG etc. O asemena redare a codului genetic apare în unele lucrări legate de secvențierea cADN. Prima bază a codonului este înscrisă în centrul imaginii, într-unul din cele patru sectoare ale cercului interior. A doua bază a codonului este trecută în următorul cerc, într-unul din cele 16 sectoare ale sale, iar a treia bază a codonului este trecută în cel de al treilea cerc, pe când la periferie sunt trecute cei trei codoni stop (ocru, ambră și azur) precum și aminoacizii principali ce intră în structura proteinelor..

ce codifică tot pentru metionină. La procariote, codonul de inițiere AUG condiționează inițierea catenei polipeptidice cu un aminoacid modificat N–formil-metionina, pe când, la eucariote, același codon condiționează inițierea catenelor polipeptidice cu aminoacidul obișnuit, metionina.

Utilizarea în sistemele acelulare de sinteză proteinică a unor componente de proveniențe foarte diferite, ribozomi și ARNt-uri de la alte specii de bacterii, nu numai de la *Escherichia coli*, apoi de la drojdii, plante și animale, a permis să se stabilească că toți codonii au aceeași semnificație informațională, codificatoare, la toate sistemele biologice. De aici, s-a tras concluzia asupra existenței *universalității codului genetic*.

Considerând valoarea informațională a celor 64 de codoni ce rezultă din relația matematică 4^3=64, se poate constata că unul din aceștia –AUG — are valoare de inițiere a mesajului genetic și implicit de inițiere a sintezei catenei polipeptidice, pe când trei dintre aceștia au valoare de codon stop, de terminare a mesajului genetic, a cadrului său de citire, respectiv a catenei polipeptidice. Rezultă că rămân 61 de codoni cu valoare de codificare. Aceștia sunt codonii sens, pentru cei 20 de aminoacizi principali, care intră în compoziția tuturor catenelor polipeptidice. Este evident că pentru fiecare aminoacid revine mai mult de un singur codon, spre a fi codificat, adică poziționat în catena polipeptidică, la locul corespunzător, dictat de informația genetică de la nivelul genei, respectiv de mesajul genetic, de la nivelul ARNm. De exemplu, glicina este codificată de 4 codoni care se numesc *codoni sinonimi* și care diferă doar prin ultima bază: GGU, GGG, GGC, și GGA. Sunt câte 6 codoni sinonimi pentru serină (UCU, UCC, UCA, UCG, AGU și AGC), arginină (CGU, CGG, CGC, CGA, AGA și AGG) și leucină (CUU, CUA; CUC, CUG, UUA și UUG). Singurele excepții de la **redundanța (degenerarea)** codificării genetice sunt pentru aminoacizii triptofan, codificat doar de către codonul UGG și metionină, codificată doar de către codonul AUG. Se mai consemnează valoarea de codon de inițiere pentru GUG care codifică pentru valină, atunci când în cazuri rarisime, catena polipeptidică începe cu acest aminoacid. Când aminoacidul valină se află în interiorul catenei polipeptidice, el este codificat de codonii sinonimi GUU, GUC sau GUA. In cazul metioninei, același codon AUG codifică acest aminoacid, fie că este la începutul catenei polipeptidice, fie că este în interiorul acesteia. In acest caz, celula dispune de mecanisme speciale, de recunoaștere a codonului AUG aflat la începutul mesajului genetic și a codonilor AUG dispuși în diferite situsuri, în interiorul mesajului genetic.

Regulile generale ale redundanței (degenerării) codului genetic sunt următoarele:

- Perechile de codoni cu formula generală XYC și XYU codifică totdeauna același aminoacid;
- Perechile XYG și XYA codifică, de obicei, același aminoacid. In formulele de mai sus, X și Y poate fi oricare ribonucleotid.

Semnificația biologică a redundanței (degenerării) codului genetic este minimalizarea efectului dăunător al mutației. Dacă nu ar fi existat redundanța (degenerarea) codului genetic, atunci, din cei 64 de codoni ai codului genetic organizat în triplete, 44 ar fi avut valoare de codoni stop, astfel că două treimi din schimbările în secvența de baze nu ar fi putut conduce la asigurarea capacităților adaptative (fitnes) ale unui organism, limitând drastic posibilitățile procesului evolutiv.

S-a propus că a existat un cod genetic original, inițial, bazat pe dublete de baze azotate și un sistem de sinteză proteinică cu 15 aminoacizi. In cadrul acestui cod genetic primitiv ar fi existat doar un singur codon stop. Cea de a treia bază azotată ar fi putut fi utilizată fie ca spațiator, participând la sistemul de aliniere a moleculelor ce intervin în decodificarea informației genetice, sau ar fi avut rolul de a stabiliza legarea la ribozom.

Confirmarea directă a semnificației codului genetic s-a realizat analizând secvența de aminoacizi a proteinei capsidei virale de la virusul mozaicului tutunului (VMT), de la tipul sălbatic (normal) și de la formele mutante. La una dintre aceste mutante, s-a observat o substituție a Prolinei cu Serina care poate fi consecința unor substituții în ARN viral al VMT care determină una dintre următoarele modificări de codoni: CCC→UCC; CCU→UCU; CCA → UCA și CCG→ UCG, verificându-se deopotrivă corespondnța dintre secvența codului din acizii nucleici și secvența aminoacizilor din catenele plipeptidice și semnificația codificatoare a codonilor. Această corespondență s-a numit *colinearitate.* Această colinearitate a fost dovedită și prin studiul hemoglobinelor normale și mutante. Astfel, analiza catenei β din hemoglobina normală HbA și din hemoglobina mutantă HbS, a dovedit că hemoglobina HbS, care este caracteristică anemiei falciforme (drepanocitozei), are în catena β, în poziția a-6-a, aminoacidul valină, pe când hemoglobina normală are în această poziție, în aceeași catenă β, acidul glutamic. Mutația la nivelul genei a fost reprezentată de o substituție de baze azotate de tipul transversiei (T este înlocuită de A) care modifică codonul CTT în codon CAT, astfel că prin transcriere în ARNm, codonul GAA, care specifică aciul glutamic, va fi convertit în codon GUA, care specifică valina. In cazul altor hemoglobine mutante, codonul GAA este convertit în codon AAA, astfel că, în hemoglobină, acidul glutamic va fi înlocuit cu lizină. In acest caz, la nivelul genei pentru hemoglobină, adică la nivelul, ADN, are loc o tranziție a lui C în T, astfel că din codonul CTT va rezulta codonul TTT care va fi trascris la nivelul ARNm pentru hemoglobină, în codon AAA. In cazul în care apar codoni terminatori (stop) din codoni sens, codificatori de aminoacizi, în urma tranzițiilor sau a transversiilor, apar catene polipeptidice mai scurte. De exemplu, în urma unor asemenea mutații numite **mutații non-sens**, codonul UAC, care codifică pentru tirozină, devine codon *UAG*, care este **codon stop**. Aminoacizii sunt codificați de codonii din ARNm, în sensul că acești codoni din ARNm dictează, adică stabilesc, poziția fiecărui aminoacid, în catena polipeptidică. Spunem, cu alte cuvinte, că ARNm, prin secvența sa de codoni, poziționează aminoacizii în catena polipeptidică. Aceasta este semnificația noțiunii de „codificare pentru“ sau „specificare“, atunci când ne referim la valența codificatoare a secvenței de baze azotate a acizilor nucleici.

Codul genetic este **nesuprapus** sau neacoperit, deoarece în cadrul codului genetic operațional, codonii sunt entități codificatoare de sine stătătoare, care nu au nucleotide comune, adică nu își împrumută nucleotide de la codonii învecinați. Mesajul genetic este citit codon–după–codon, între doi codoni succesivi nefiind „*virgule*“ adică neinterpunându-se alte necleotide. Astfel codul genetic este „*fără virgule*“. În sfârșit, codul genetic este *universal*, aceiași codoni codificând pentru aceiași aminoacizi la toate virusurile în însuși procesul de apariție a vieții. Așa se explică de ce ARNm purtător al mesajului genetic pentru sinteza hemoglobinei de iepure poate fi tradus în ovocitele broaștei cu gheare sud-africane *Xenopus laevis* sau mesageri genetici de la specia umană (ARNm pentru insulină) pot fi traduși în celula bacteriană *Escherichia coli*.

5. CODUL GENETIC AL MITOCONDRIILOR

Funcția principală a mitocondriilor este de a produce ATP și alți compuși înmagazinatori de energie. ADN mitocondrial (ADNmt) are o greutate moleculară de circa 10^7 și codifică majoritatea enzimelor mitocondriale, reprezentând matrița pentru sinteza tuturor moleculelor de ARNt mitocondrial.

În anul 1979, după 16 ani de credință în universalitatea codului genetic, lumea biologiei moleculare a fost șocată de descoperirea că la mitocondrii, codul genetic nu este același cu cel „universal". Mai mult încă, în anul 1980, s-a descoperit că la diferite organisme apar diferite coduri genetice mitocondriale. In luna Aprilie a anului 1981, s-a reușit să se secvențieze complet ADNmt uman, constatându-se că acesta are 16.569 de perechi de baze azotate. In cadrul acestei secvențe au fost identificate genele pentru ARNr 12S și ARNr 16S, genele pentru 22 de tipuri diferite de ARNt, genele pentru trei subunități ale enzimei citocromoxidază (a căror secvență de aminoacizi era cunoscută), apoi genele pentru citocrom b și numeroase alte enzime. S-au izolat și câteva molecule de ARNm mitocondrial, putându-se localiza în ADNmt, sectoarele transcrise în acestea. Comparând secvența de aminoacizi a numeroaselor proteine cu secvențele de baze ale moleculelor de ARNm și cu secvențele din ADNmt, s-a putut confirma faptul că codul genetic mitocondrial nu este același, precum codul genetic universal, ceea ce a trebuit să aibe profunde implicații în evoluția mitocondriilor.

Codul genetic mitocondrial uman (pentru mitocondriile altor specii apar și alte diferențe) este redat mai jos:

Prima poziție Terminal 5'	A doua poziție				A treia poziție Terminal 3'
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	Stop	Trp	A
	Leu	Ser	Stop	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Met	Thr	Lys	Stop	A
	Met	Thr	Lys	Stop	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

Din analiza acestui cod genetic mitocondrial se desprind următoarele concluzii:

- In mitocondriile umane codonul UGA codifică triptofanul, neavând funcția de codon terminator, ca în codul genetic nuclear (universal);
- Codonii AGA și AGG devin codoni terminatori (stop);
- Codonii AUA și AUU sunt codoni de inițiere, ca de altfel și AUG, care își păstrează semnificația din codul genetic nuclear (universal). Ambii codoni AUA și AUG codifică pentru metionină, pe când codonul AUU codifică pentru izoleucină;
- AUA codifică pentru metionină (un inițiator), în loc de a codifica izoleucină, așa cum o face în codul genetic nuclear (universal).

Numărul de molecule ARNt mitocondrial este de 22, adică cu mult mai mic față de numărul minimal al acestora în citosol, care este de cel puțin 32 și care traduc codul genetic nuclear (universal). Acest fapt este posibil, deoarece în fiecare dintre seturile repetate de patru ori — de exemplu, patru codoni pentru alanină (GCU, GCA, GCG și GCC) — este utilizat doar un singur tip de ARNt, în loc de două tipuri. In fiecare set de patru molecule de ARNt, baza din poziția *wobble* (a treia) a anticodonului este U sau U modificat (deci nu este Inozina- I). Nu se știe dacă acest U se împerechează slab cu fiecare din cele patru baze posibile. Pentru codonii care sunt dublu redundanți, de exemplu, cei doi codoni pentru histidină, CAU și CAC, baza *wobble* formează întotdeauna perechea G — U, ca în codul genetic universal (nuclear).

Structura moleculei de ARNt mitocondrial este diferită de aceea a moleculei standard de ARNt, cu excepția ARN_t^{LEU} mitocondrial. Caracteristicile structurale ale ARNt mitocondrial sunt următoarele:

- Secvența universală CTΨC — A apare în ARNt mitocondrial;
- Secvența „constantă“ de 7 perechi de baze, din tija buclei TΨC, variază de la 3 la 9 baze;
- Bazele invariante U_8, A_{14}, G_{15}, G_{18}, G_{19} și U_{48} ale moleculei standard de ARNt nu sunt invariante în ARNt mitocondrial.

In moleculele standard de ARNt, fiecare din aceste baze este implicată în formarea punților care produc molecula pliată în formă de L.

Astfel, molecula de ARNt mitocondrial pare a fi stabilizată de mai puține interacțiuni. Configurațiile tridimensionale ale acestor molecule nu se cunosc cu siguranță, dar, este posibil ca ele să difere de la forma standard L și ARNt mitocondrial se angajează într-un tip diferit de interacțiune cu ribozomul, decât moleculele standard de ARNt din citosol.

Examinarea secvenței de baze a 13 cadre diferite de citire din molecula de ADNmt arată că în 7 din acestea nu apar codoni de terminalizare. Fiecare din aceste gene, cu excepția doar a uneia, se află imediat adiacentă unei gene ARNt. In fiecare caz, exact înaintea genei CO III, apare o timină în ADN, în prima poziție a codonului, în cadrul de citire.

Cele mai multe molecule de ADN nuclear conțin lungi asemenea segmente necodificatoare (spațiatori) între gene. In cazul ADNmt, între gene apar doar puține baze spațiatoare sau nu apar deloc asemenea spațiatori. In fiecare caz, există un codon start (AUG, AUA sau AUU) la capătul 5' al moleculei de ARNm sau la nivelul câtorva baze în aval de la acest terminal. Aceasta ridică problema situsului de recunoaștere, deoarece în mitocondrii nu se întâlnește secvența Shine-Dalgarno sau vreun echivalent al ei. Codonul start care este recunoscut în sinteza proteinică la eucariote este totdeauna cel care este cel mai aproape de capătul 5' al moleculei de ARNm.

Această situație se întâlnește și în cazul ARNm din mitocondrii. Moleculele de ARNm sintetizate pe matrița de ADN nuclear prezintă secvența lider despre care se crede că este responsabilă de legarea ARNm la ribozom, dar în moleculele de ARNm mitocondrial nu s-a putut identifica o asemenea secvență. Cea mai plauzibilă explicație este aceea că terminalul 5' al unei molecule de ARNm mitocondrial este capabil de a se lega la ribozom, fără a necesita secvența lider sau, nu putem exclude că aceasta este legată de specificul organizării nucleare. In mitocondrii, inițierea traducerii ARNm este asemănătoare cu cea de la eucariote (din citosol), dar proteinele sunt inițiate cu fMet, ca la procariote.

CAPITOLUL IX

DECODIFICAREA SAU TRANSLAȚIA (TRADUCEREA) MESAJULUI GENETIC

1. ROLUL ARNt ȘI AL AMINOACIL-ARNt-SINTETAZELOR

Decodificarea informației genetice implică două etape succesive, interconectate, transcripția genetică și translația genetică. Dacă replicarea ADN asigură transferul informațional de la ADN preexistent la ADN progen, transcripția genetică asigură transferul informațional de la ADN la ARN, cu sinteza tuturor categoriilor de ARN celular, fiecare jucând un rol specific și esențial în etapa translației. Relația ADN–ARN–Proteine constituie esența *axiomei centrale a biologiei moleculare*, cunoscută în perioada elaborării sale – anii 1960 – ca *dogma centrală a Geneticii* (fig. 1).

Translația genetică, adică traducerea mesajului genetic (purtat de ARNm) dintr-o secvență de codoni, într-o secvență de aminoacizi, cu sinteza unei anumite catene polipeptidice, este un proces complex, în care participă circa două sute de macromolecule distincte de acizi nucleici și proteine. Este o reînnoită povară pentru celulă să realizeze sinteza unei catene polipeptidice, deoarece în cadrul acestui proces sunt utilizate foarte numeroase alte proteine cu rol structural, enzimatic și reglator, la care se adaugă un consum considerabil de energie.

Acest uriaș efort pe care celula este nevoită să îl depună în sinteza unei catene polipeptidice este cerut de extrema precizie cu care trebuie să aibă loc asemenea sinteză, orice eroare în acest proces având valența unei mutații deletorii, afectând drastic sau chiar compromițând funcția proteinei sintetizate.

Translația mesajului genetic, sau decodificarea propriu-zisă, asigură traducerea secvenței de codoni din ARNm, într-o secvență de aminoacizi din catena polipeptidică, a cărei sinteză este dirijată de o anumită genă. Numai că, aminoacizii nu pot ei înșiși să se alinieze pe molecula de ARNm și să recunoască direct codonii care îi specifică (le determină poziția exactă în catena polipeptidică) și nici cu ribozomii nu pot interacționa prin ei înșiși. In consecință, este necesară intervenția unui sistem adaptator între aminoacizi și ARNm. Acest sistem adaptator este reprezentat de un set de molecule de ARNt, în nemijlocită cooperare cu un set de ENZIME COGNATE numite AMINOACIL-ARNt-SINTETAZE sau AMINOACIL-ARNt-LIGAZE. Aceste enzime asigură încărcarea, cu strictă

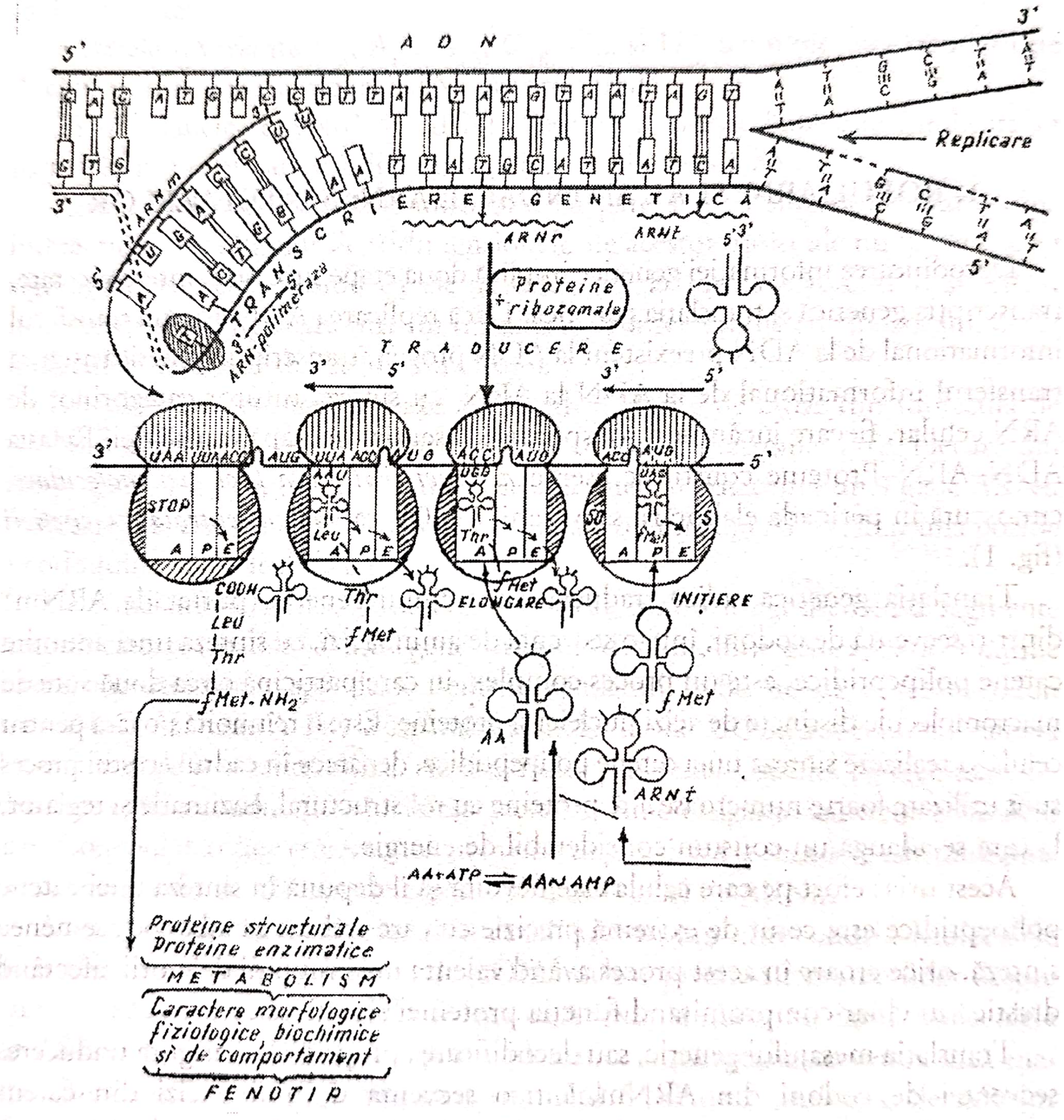

A D N
5'
3'
Replicare
TRANSCRIERE GENETICĂ
ARNm
ARN-polimeraza
ARNr
ARNt
Proteine +ribozomale
TRADUCERE
UAA
UUA
ACC
AUG
STOP
A P E
COOH
Leu
Thr
fMet-NH2
fMet
ELONGARE
INIȚIERE
AA
AA+ATP ⇌ AA~AMP
Proteine structurale
Proteine enzimatice
METABOLISM
Caractere morfologice, fiziologice, biochimice și de comportament
FENOTIP

Fig. 1 — Axioma centrală a biologiei moleculare – trepte ale transferului informațional în sistemele biologice (original).

specificitate, a unui ARNt, cu acel aminoacid care este codificat de un codon din ARNm, a cărui secvență este complementară secvenței anticodonului acelui ARNt și numai sub această formă încărcată într-un ARNt specific lui, un anumit aminoacid poate pătrunde în ribozom.

In celulă se află numeroase molecule de ARNt.

Fiecare moleculă de ARNt are mai multe regiuni importante, dintre care trei sunt direct legate de procesul decodificării. Una este regiunea ANTICODONULUI, în care se află ANTICODONUL, adică o secvență continuă de trei baze azotate care, la nivelul ribozomului, se împerechează prin punți de hidrogen, pe principiul complementarității, cu tripleta de baze azotate a codonului corespunzător din ARNm. O altă regiune din ARNt, relevantă în decodificare, este reprezentată de situsul de atașare a aminoacidului. Aminoacidul este atașat în cadrul unei cooperări stricte ARNt — aminoacil-ARNt-sintetază, în așa fel încât, acest aminoacid să corespundă codonului specific lui, din ARNm. Acest codon din ARNm este recunoscut de către secvența complementară anticodonului din ARNt, care poartă aminoacidul corespunzător acelui codon.

Enzima aminoacil-ARNt-sintetaza „veghează" la potrivirea corectă dintre aminoacid și anticodon, ea fiind în esență o enzimă cognată, capabilă de a recunoaște cu mare specificitate tipul de ARNt corespunzător unui aminoacid, potrivit relației complementare anticodon-codon.

Aminoacil-sintetazele își recunosc ARNt corespunzători, existând o regiune specifică în molecula de ARNt, pe care o recunosc cu mare specificitate, spre a asigura încărcarea fiecărui ARNt cu aminoacidul potrivit. Aceasta este cea de a treia regiune din ARNt, relevantă pentru decodificare.

Diferitele tipuri de ARNt sunt desemnate după aminoacidul cu care se încarcă. Bunăoară, ARNt care se încarcă cu leucină în citosol, spre a transporta acest aminoacid la ribozomi, este desemnat $ARN_t^{I.eu}$. Redundanța (degenerarea) codului genetic face ca să existe doi asemenea ARNt, desemnați $ARNt_I^{I.eu}$ și $ARNt_{II}^{I.eu}$. Aceste două tipuri de ARNt care transportă același aminoacid la ribozomi, se numesc $ART_t^{I.eu}$ IZOACCEPTORI. Pentru o mai exactă desemnare a lor este trecută și secvența anticodonului: $ARN_t^{I.eu}{}_{UUA}$ și $ARN_t^{I.eu}{}_{CUA}$.

Molecula de ARNt și aminoacil-sintetaza corespunzătoare acesteia poartă denumirea de elemente sau molecule cognate, utilizându-se în descrierea lor expresia: *„molecula cognată de ARNt și sintetaza sa cognată"*. Denumirea de aminoacil-sintetaza este nefericit aleasă, după părerea noastră. Mai adecvată este denumirea de aminoacil-ARNt-ligaza.

Bucla anticodonului din ARNt conține 7 baze, anticodonul ocupând în molecula standard de ARNt pozițiile 34, 35 și 36, fiind totdeauna precedat de două pirimidine; de regulă poziția 34 este ocupată de o uridină. Anticodonul este urmat de o purină modificată.

Convențional, nucleotidele din ARNt sunt numerotate de la 1 la 76 sau 93 (depinzând de lungimea reală a secvenței fiecărei molecule de ARNt), începând de la terminalul 5'-P.

In anul 1965, Robert Holley și colaboratorii săi au elaborat **modelul frunzei de trifoi** al structurii secundare a moleculei de ARNt pentru alanină de la drojdia de bere, *Saccharomyces cerevisiae*, pornind de la stabilirea structurii primare a acestei molecule de ARNt, reprezentată de secvența sa de ribonucleotide care a fost desemnată secvență standard a ARNt pentru alanină. Moleculele de ARNt pentru alți aminoacizi au unele variații care se abat de la această structură standard. Au fost secvențiate peste 200 de molecule de ARNt la bacterii, drojdii, plante, animale și om. Există numeroase baze azotate modificate în ARNt, printre care *dihidrouridina (DHU), riboziltimina (rT) pseudouridina* (Ψ) *și inozina (I)*, situate la nivelul buclelor structurii secundare, adică al secvențelor neîmperecheate care generează regiunile monocatenare ale ARNt. Situsul de atașare a aminoacidului activat la ARNt cognat este localizat la nivelul restului adenozină (A) al secvenței CCA, de la capătul 3' al acestei molecule.

Secvenței standard i se adaugă nucleotide adiționale în pozițiile 17, 20 și 47 desemnate 17.1, 17.2, 17.3 etc, 20.1, 20.2, 20,3 etc și 47.1, 47.2, 47.3, etc. astfel că lungimea diferitelor molecule de ARNt este variabilă între 76 și 93 nucleotide, dar rămân invariante pozițiile 8, 11, 14, 15, 18, 19, 21, 24, 32, 33, 37, 48, 53, 54, 55, 57, 58, 60, 61, 74, 75, 76. Terminalul 3'-OH este **ramura acceptoare de aminoacid activat** sau **ramura CCA.**

Bucla dihidrouracilului (DHU) conține bazele 14-21 , dar ea poate conține între pozițiile 17 și 18, încă 3 nucleotide suplimentare, precum și 1-3 nucleotide suplimentare după poziția 19.

Bucla pseudouracilului, desemnată **bucla** TΨC, conține nucleotidele de la 54 la 60.

Regiunile bicatenare se numesc *brațele* sau *tulpinile* modelului ARNt și ele nu conțin nucleotide invariante, dar conțin, pe lângă perechi de tip Watson-Crick (G≡C și A=U) și perechi neobișnuite de tip G=U.

Bucla suplimentară conține nucleotidele de la 44 la 48.

La moleculele cele mai mici de ARNt această buclă conține 4 nucleotide, pe când moleculele mai mari de ARNt conțin în această buclă 16 nucleotide. Funcția buclei suplimentare, cu o secvență de nucleotide înalt variabilă, nu este cunoscută.

In configurația tridimensională, (structură terțiară), analizată prin studii cristalografice, macromolecula ARNt este astfel pliată încât apar două ramuri helicoidale bicatenare, fiecare având 60Å lungime, fiind dispuse perpendicular

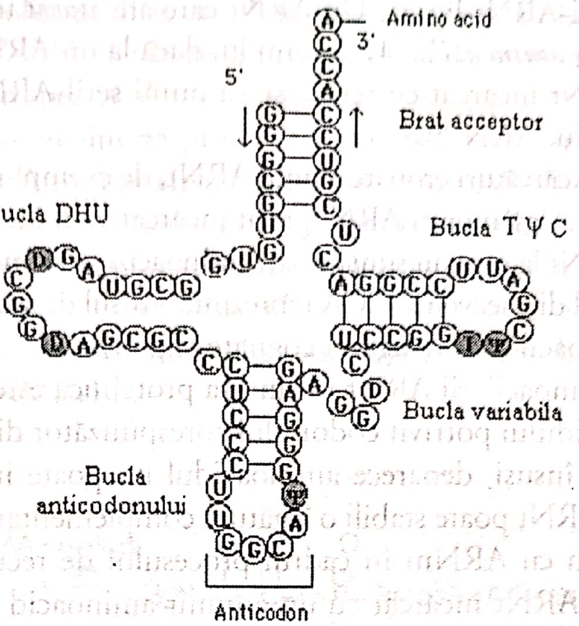


Fig. 2 — Structura terțiară a macromoleculei de ARNt modelul „frunzele de trifoi" (Holley, 1965)

una pe cealaltă, conferind astfel forma de L, cu o ramură ce cuprinde tulpina acceptoare a aminoacidului si bucla TΨC, cealaltă ramură având buclele anticodonului si DHU. (fig. 2).

Unul din capetele „L" reprezintă terminalul acceptor, pe când celălalt terminal al „L" reprezintă bucla anticodonului, fiind separate de o distanță de 80 Å. Toate nucleotidele sunt stivuite, cu excepția celor din pozițiile 16, 17, 20, 47 și 76.

Structura tridimensională este realizată prin interacția a 9 perechi de baze numite perechile terțiare de baze, dintre care doar una are împerechere Watson-Crick, fiind G≡C. Grupul 2' OH al ribozelor este implicat în realizarea structurii terțiare a ARNt.

Cele mai multe dintre aceste perechi sunt formate din baze care sunt conservate în toate moleculele de ARNt, de unde s-a dedus că toate moleculele de ARNt trebuie să aibă aceiași structura generală de bază, afirmație bazată și pe constatarea că diferitele molecule de ARNt pot cristaliza, formând un cristal uniform.

Bucla DHU este implicată în interacția cu ARN ribozomal, adică cu ribozomul, aflându-se în colțul conformației „L", la distanța maximă de capătul 3'- OH CCA și de bucla anticodonului.

Atașarea unui aminoacid la ARNt corespunzător are loc numai dacă aminoacidul se află în stare activată, adică atașat la un AMP sub acțiunea aceleiași enzime cognate aminoacil-ARNt-ligaza. Un ARNt care are atașat un aminoacid este un *ARNt încărcat* sau *aminoacilat*. De exemplu, dacă la un ARNt se atașează serina, un asemenea ARNt încărcat cu serină se va numi seril-ARN$_t^{Ser}$ sau seril-ARNt, sau, cel mai simplu, ARN$_t^{Ser}$.

In cazul unei încărcături eronate a unui ARNt, de exemplu a ARN$_t^{Leu}$ cu Serina, în loc de leucina, un asemenea ARNt greșit încărcat va fi desemnat seril-ARN$_t^{Leu}$. Moleculele de ARNt la care nu sunt atașați aminoacizi se numesc ARNt neîncărcați.

Restul adenozil din secvența CCA reprezintă situsul de atașare a aminoacidului, sub cataliza aminoacil-ARNt-ligazei cognate (fig. 3).

Implicarea aminoacilării ARNt în sinteza proteinică este datorată faptului că alinierea aminoacidului potrivit codonului corespunzător din ARNm nu o poate face aminoacidul însuși, deoarece aminoacidul nu poate interacționa direct cu ARNm. Numai ARNt poate stabili o legătură complementară prin formarea unor punți de hidrogen cu ARNm în cadrul procesului de recunoaștere CODON-ANTICODON. ARNt încărcat cu un anumit aminoacid poate recunoaște, cu ajutorul anticodonului său, codonul din ARNm care codifică pentru aminoacidul cu care el este încărcat. Recunoașterea codon-anticodon, asigură selecția corectă a aminoacizilor pentru asamblarea lor într-o catenă polipeptidică, în conformitate cu informația genetică conținută în ADN (în gena pentru o anumită proteină).

In al doilea rând, implicarea aminoacilării ARNt în sinteza proteinică are un determinism termodinamic: atunci când sunt uniți aminoacizi neîncărcați în ARNt, este favorizată hidroliza legăturii peptidice și nu realizarea acesteia. Pentru a contracara evoluția reacției în sensul hidrolizei, aminoacizii nu participă, ca atare,

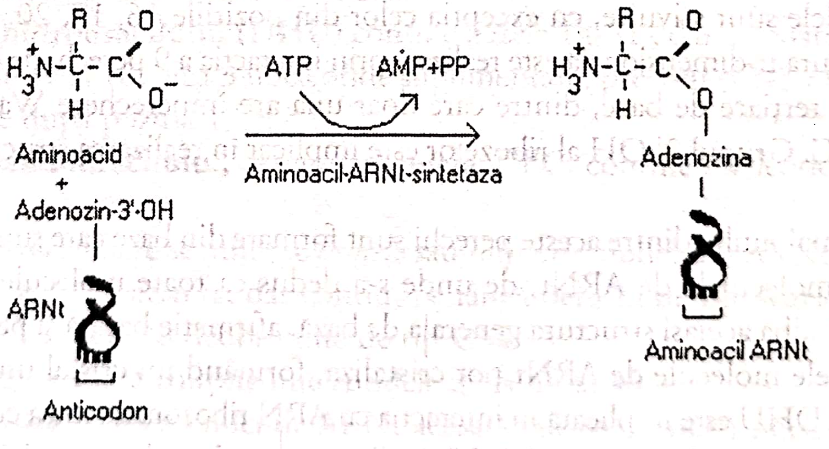
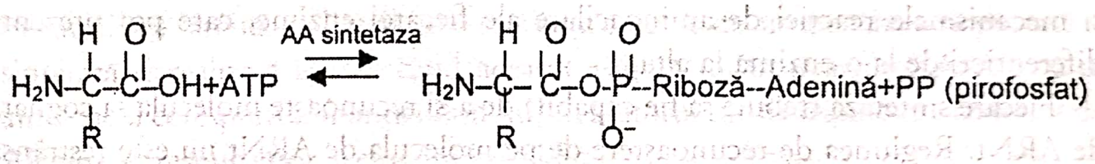


Fig. 3 — Activarea aminoacizilor pentru încorporarea lor în proteine. Enzima aminoacil-ARNt-sintetaza recunoaște atât un anumit aminoacid cât și ARN-ul corespunzător lui. Această enzimă catalizează formarea unui aminoacil-ARNt pe baza energiei furnizate de hidroliza unei molecule de ATP.

în sinteza catenelor polipeptidice, ci sub forma unui ester aminoacid, realizat cu grupul 2'-OH sau 3'-OH al ribozei nucleotidului, de la terminalul 3'-OH al moleculei de ARNt, respectiv al adenozinei (A).

Intermediarul activ în sinteza proteinică este deci, nu aminoacidul ca atare, ci esterul aminoacid. Aminoacilarea (încărcarea unui ARNt cu un aminoacid corespunzător) are loc în două etape succesive, ambele catalizate de aceeași enzimă aminoacil-ARNt-sintetaza (aminoacil-ARNt-ligaza) care recunoaște atât ARNt-ul corespunzător cât și aminoacidul activat, adecvat ARNt la care se atașează. In prima etapă are loc activarea aminoacidului în cadrul unei reacții dintre aminoacid și ATP, rezultând AA~AMP+PP.



$$H_2N-\underset{R}{\overset{H}{C}}-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-OH+ATP \xrightleftharpoons{\text{AA sintetaza}} H_2N-\underset{R}{\overset{H}{C}}-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-O-\underset{O^-}{\overset{O}{\overset{\|}{P}}}\text{--Riboză--Adenină}+PP\text{ (pirofosfat)}$$

In a doua etapă, are loc TRANSFERUL AMINOACIDULUI ACTIVAT la ARNt corespunzător . ARNt încărcat cu un aminoacid devine ARNt aminoacilat.

Aminoacil ~ AMP+ARNt →Aminoacil ~ ARNt + AMP.

Reacția de transfer al aminoacidului activat la ARNt corespunzător este o reacție de echilibru, în care nici o direcție nu este predominantă. Energia necesară desfășurării acestei reacții rezultă, ca și în cazul sintezei ADN și ARN, din hidroliza pirofosfatului.

Reacția generală are următoarea desfășurare:

Aminoacid + ATP + ARNt + H_2O →Aminoacil~ARNt + AMP + PP

2. AMINOACIL-ARNt-SINTETAZELE (*AMINOACIL–ARNt–LIGAZE*)

Există cel puțin una și, de obicei, doar o singură aminoacil-ARNt-sintetază pentru fiecare aminoacid. Pentru aminoacizii specificați de mai mulți codoni, există mai multe aminoacil-ARNt-sintetaze, câte una pentru fiecare tip de relație codon-anticodon-aminoacid. Până în anul 1982, fuseseră purificate 19 aminoacil-ARNt-sintetaze, corespunzând la 17 aminoacizi. Deoarece trebuie să existe câte o sintetază și pentru fiecare dintre ceilalți 3 aminoacizi, înseamnă că numărul total de sintetaze ar trebui să fie de cel puțin 22. Este evident fapul că aceste enzime trebuie să fie foarte specifice, spre a recunoaște deopotrivă o anumită moleculă de ARNt și o anumită moleculă de aminoacid.

Cum moleculele de ARNt prezintă mari similitudini structurale, ne-am aștepta ca și sintetazele să prezinte similitudini structurale, ceea ce nu este cazul. S-au identificat trei clase de sintetaze:

- care constau dintr-o singură catenă polipeptidică;
- care constau din două catene polipeptidice identice;
- care constau din patru catene polipeptidice de două tipuri distincte, câte două copii ale fiecărui tip.

Greutatea moleculară a subunităților aminoacil-ARNt-ligazelor variază de la 33.000 la 113.000, pe când greutatea moleculară a holoenzimei variază de la 54.000 la 270.000 daltoni. Rezultă clar faptul că aceste enzime, esențiale în decodificarea informației ereditare, constituie un grup heterogen de proteine. Mai sunt multe aspecte care trebuiesc descifrate, referitoare la semnificația acestei heterogenități și mecanismele reacției de aminoacilare ale fiecărei enzime, care pot prezenta diferențieri de la o enzimă la alta.

Fiecare sintetază trebuie să fie capabilă de a-și recunoaște molecula sa cognată de ARNt. Regiunea de recunoaștere de pe molecula de ARNt nu este restrânsă la un singur situs al acestei molecule, ci se întinde de-a lungul întregii molecule . Prin experiențe de cross-linkare, prin care moleculele de sintetază au fost legate la molecule de ARNt și apoi au fost supuse iradierii cu UV, s-a determinat apariția de legături chimice (legături încrucișate) dintre baze azotate din ARNt și aminoacizi din aminoacil-ARNt-ligaza. Aceste cross-link-uri pot apare numai dacă bazele se află la 2-3 Å distanță de un aminoacid. După iradiere, molecula de ARNt este fragmentată și oligonucleotidele legate la proteine sunt identificate prin electoforeză. Fiecare fragment oligonucleotidic provine dintr-un anumit segment al ARNt ce este bine cunoscut ca secvență. In cadrul metodei de protecție la RN-ază, complexul este tratat cu o colecție de RNaze care pot digera tot ceea ce poate fi atins de ele, într-o moleculă de ARNt. Sunt protejate doar sectoarele la nivelul cărora molecula de ARNt este în contact cu sintetaza. Pe această cale, a fost evidențiată existența a mai multor puncte de contact dintre ARNt și sintetaze, incluzând regiunea tulpinală acceptoare, bucla anticodonului și bucla suplimentară. Toate punctele de contact se află pe aceeași parte a structurii tridimensionale. Nucleotidele neobișnuite sunt rareori angajate în acest contact, fiind în schimb implicate în atașarea la ribozom. Specificitatea de aminoacilare nu derivă numai din abilitatea de legare, ci și din structura tridimensională a fiecărei molecule de ARNt care servește la plasarea adeninei de la terminalul 3', în situsul de aminoacilare al sintetazei.

Plasarea fiecărui aminoacid în catena polipeptidică în creștere este determinată numai de interacțiunea codon-anticodon. Dovedirea acestui fapt s-a realizat în cadrul unei experiențe elegante de sinteză în sisteme acelulare. O probă de ARNt poate fi acilată într-un amestec de reacție ce conține toate sintetazele, 19 aminoacizi neradioactivi și cisteina marcată radioactiv cu ^{14}C. Singurul ARNt va fi, în consecință, reprezentat de ^{14}C cisteil-ARNt sau $ARNt^{Cys}$, încărcat radioactiv.

Moleculele de ARNt încărcate vor fi apoi hidrogenate cu nichel Raney care determină conversia ^{14}C cisteinei în ^{14}C alanină. In consecință, singurele molecule de ARNt radioactive vor fi apoi utilizate într-un sistem de sinteză proteinică in vitro, ce conține ARNm pentru hemoglobină, ca singurul tip de ARNm. Se sintetizează hemoglobina care este izolată și se determină secvența de aminoacizi a acesteia. Se constată că ^{14}C alanina este prezentă în situsurile ocupate în mod normal de cisteină. De aici, s-a tras o concluzie foarte importantă și anume că *APARATUL DE SINTEZĂ PROTEINICĂ NU EXAMINEAZĂ IDENTITATEA FIECĂRUI AMINOACID, CI DOAR ACEEA A MOLECULEI DE ARNt.* Aceasta înseamnă că sarcina realizării unei secvențe corecte de aminoacizi este purtată de sintetază și realizată atunci când aceasta asigură încărcarea unui ARNt cu un aminoacid corespunzător anticodonului cu ajutorul căruia recunoaște codonul din ARNm, corespunzător acelui aminoacid.

Numeroși aminoacizi sunt similari structural și este de așteptat ca sintetazele să comită erori. Dacă frecvența erorilor este mare, este rezonabil să așteptăm să intervină un mecanism de corectare a erorilor, comparabil cu **proofreading** întâlnit în sinteza ADN.

Valina și izoleucina constituie o pereche ambiguă de aminoacizi, și de fapt, izoleucil-ARNt sintetaza formează valil-AMP care rămâne legat la sintetază, cu o frecvență de circa 1 la 225 evenimente de activare. Aceasta ar însemna ca 1/225 din toate pozițiile izoleucinei din proteine să poată conține o valină. Pentru o proteină tipică ce conține 500 aminoacizi, din care 25 sunt izoleucine, circa o copie la 9 ar fi alterată. Deoarece există cel puțin 10 exemple cunoscute de aminoacilare eronată, ar putea fi câte o eroare în aproape fiecare moleculă. Dar, această situație nu se înregistrează totuși, tocmai datorită intervenției mecanismelor de corectare a erorilor.

Mecanismul care corectează eroarea valină-izoleucină este o etapă hidrolitică în care valil-AMP este clivat. Hidroliza este realizată de către însăși izoleucil-ARNt-sintetaza. Interesant apare faptul că semnalul care activează funcția hidrolitică este tocmai încercarea valinei de a se lega la $ARNt^{Ile}$. Când sistemul de corectare eșuează, se formează valil-$ARNt^{Ile}$ care are o frecvență de 1 în 800. Astfel, frecvența generală cu care apare eroarea, adică fracția de situsuri ale izoleucinei ocupate de valină este de (1/225) (1/800) = 1/180.000. Dacă toate erorile de aminoacilare apar cu această frecvență, înseamnă că numai circa 0,17% din proteine ar fi deficiente.

S-a mai descris și un caz similar în care metionil ARNt sintetaza formează treonil-AMP și homocisteil-AMP.

Analiza cazurilor în care se formează un complex incorect de aminoacilare a ARNt a dus la constatarea că lanțul lateral al aminoacidului incorect încărcat nu este niciodată mai mare decât acela al aminoacidului corect atașat. Pe baza acestei constatări, s-a emis o schemă a mecanismului dublei cerneri sau dublei strecurări, potrivit căreia, aminoacizii mai mari decât cei corect atașați nu sunt niciodată activați, deoarece sunt prea mari spre a se potrivi situsului activ al sintetazei. Astfel, dimensiunea situsului activ constituie o sită. Aminoacizii care sunt mai mici decât cei corespunzători pot fi activați, deși cu o rată mai mică, deoarece se potrivesc mai puțin bine în situsul activ al enzimei. S-a mai propus că situsul hidrolitic este prea mic pentru aminoacidul corect, astfel că numai fiecare din cei 11 aminoacizi care sunt mai mici decât cel corect atașat poate fi eliminat prin hidroliză. Astfel, situsul de hidroliză se constituie în cel de-al doilea mecanism de cernere, reprezentând cea de a doua sită sau strecurătoare prin care se evită încărcarea eronată a ARNt cu aminoacizi necorespunzători. Valina și treonina au aceeași dimensiune și aproape aceeași formă. Intr-adevăr, treonina poate uneori să fie activată de valil-ARNt-sintetaza.

Funcția prezisă de editare a modelului dublei cerneri este cerută pentru a fi corectată activarea glicinei de către alanil-ARNt-sintetaza și a serinei de către treonil-ARNt-sintetaza.

Experiența cu nichel Raney arată că ARNt aminoacilat nu este supus mecanismului de corectare. Molecula de ARNt este suficient de complexă și capabilă de asemenea variație structurală, astfel că împerecherea dintre o moleculă de ARNt și o sintetază necognată trebuie să fie foarte slabă. Trebuie reamintit faptul că aminoacilarea eronată este consecința faptului că aminoacizii nu sunt atât de diferiți, unii față de alții. Frecvența de împerechere eronată este de aproximativ o pereche eronată la 10^7 perechi de baze și o asemenea frecvență redusă de eroare nu necesită un mecanism special de corectare. La ARNt nu apare mecanismul de corectare a citirii (*proofreading*). Mai mult, în supresia *missense* (de sens greșit) apar cu o frecvență mare împerecheri greșite, în cazul unor molecule mutante de ARNt.

INTERACȚIA CODON-ANTICODON

Fidelitatea sintezei proteinice este condiționată de încărcarea corectă cu aminoacidul corespunzător a unui anumit ARNt de către aminoacil-sintetaza și împerecherea corectă codon-anticodon.

Analiza semnificației de codificare a codonilor a condus la concluzia că din cei 64 de codoni posibili, doar 61 codifică pentru cei 20 de aminoacizi ce intră în mod obișnuit în structura catenelor polipeptidice și cu care sunt încărcate moleculele de ARNt. In cadrul unor experiențe cu sisteme acelulare de sinteză in vitro, în care s-au folosit diferite tipuri de ARNt purificate, s-a constatat că $ARNt_{I}^{Leu}$ induce încorporarea leucinei când se utilizeză poli-(UG). Pe de altă parte, $ARNt_{II}^{Leu}$ răspunde la poli-(UG), dar nu și la poli-(UC). Se poate deduce clar că anticodonul $ARNt_{I}^{Leu}$ se împerechează cu un codon ce poartă C, dar nu G (este vorba de codonul UUC). Dar, ideea corespondenței biunivoce: un codon — un ARNt a fost demolată odată cu constatarea că $ARNt^{Ala}$, de la drojdia de bere, secvențiat de Holley, răspunde la trei din cei patru codoni pentru Alanină (GCX) și anume la GCU, GCC și GCA. Un singur loc din molecula acestui ARNt are secvența de baze 5' — GC — 3' și, admițând că tripleta codonului constă din trei baze adiacente, aceste două baze trebuie că aparțin anticodonului. Dar, aceasta înseamnă prezența în secvența anticodonului a tripletei 5' — IGC — 3', în care I este un nucleozid neobișnuit numit INOSINA

Inosina este un nucleozid numit ribozilhipoxantina care apare în bucla anticodonului ARNt. Ea nu reprezintă o bază azotată, ci un ribonucleozid derivat al adenozinei, rezultat prin deaminarea adeninei la C_6.

Inozina (I) se poate împerechea cu U, C și A, prin formarea doar a două punți de hidrogen și deci aceste împerecheri nu vor fi împerecheri tipice Watson-Crick.

Originea chimică a inosinei în anticodon este foarte interesantă. Analiza secvenței de nucleotide, la un număr mare de molecule de ARNt, a arătat că nici un anticodon nu începe cu adenina (A). Oricând un rest adenozil (A) nemodificat apare în prima poziție a anticodonului unui ARNt, adenina va fi deaminată, devenind astfel hipoxantina. Reacția este catalizată de către o enzimă numită anticodondeaminaza. Hipoxantina este baza azotată a ribonucleozidului inosina (I). Toate resturile inosină din moleculele ARNt se formează pe această cale.

Redundanța (degenerarea) codului genetic apare ca răspuns al unui anticodon la mai mulți codoni. Cel mai deosebit aspect al redundanței este acela că, cu puține excepții, identitatea celei de a treia baze din codon apare a fi neimportantă, ceea ce înseamnă că XYA, XYB, XYC și XYD sunt codoni sinonimi.

In anul 1965, Francis Crick a propus ipoteza oscilării (*wobble hypothesis*) spre a explica faptul că unele molecule de ARNt recunosc mai mulți codoni din ARNm, explicându-se astfel degenerarea codului genetic adică redundanța sa și existența unui număr mai mic de tipuri de ARNt, față de numărul codonilor sens din ARNm. In acea perioadă, se admitea că au loc doar împerecheri G.C și A.T, în ADN, iar în ARN, doar împerecheri G.C și A.U. Intr-adevăr, pentru ADN, nu sunt posibile, în mod normal, decât împerecheri G.C și A.T, deoarece structura helicoidală regulată a dublului helix ADN impune restricții sterice: nu se pot realiza împerecheri purină-purină sau pirimidină-pirimidină, deoarece, în primul caz, nu există în cadrul dublului-helix (cu diametru fix de 20Å) suficient spațiu pentru o pereche plană purină-purină, iar în cazul al doilea de împerechere, pirimidină-pirimidină, nu se poate realiza împerecherea, deoarece fiind mai mici dimensional, două pirimidine nu se ating reciproc, spre a se împerechea. S-a văzut însă că cercetările anterioare efectuate pe polinucleotide sintetice, au evidențiat posibilitatea realizării și a altor legături în cadrul structurilor secundare și terțiare a acizilor nucleici, care nu sunt de tip Watson- Crick.

Crick a demonstrat că la nivelul buclei anticodonului, interacțiunea codon-anticodon nu impune constrângerile ce apar la nivelul dublului helix, deoarece aici se află o structură monocatenară și împerecherea cu codonul formează un sector dublu catenar care nu are dimensiunile obișnuite ale dublului helix. Cerințele sterice sunt mai puțin stringente, mai ales la nivelul poziției a treia a codonului, permițând o oscilație a împerecherii, deci un mic joc în structură (acest joc este numit **wobble**). Crick a demonstrat că și alte împerecheri de baze se pot realiza între codon și anticodon. Spre a fi maximalizată stabilitatea, primele două perechi de baze sunt de tip obișnuit (perechi Watson-Crick) adică sunt împerecheri standard, pe când a treia pereche de baze poate fi și de tip purină-purină, fără a produce prea mare distorsionare, la nivelul macromoleculei ARNt. Astfel, dacă în poziția a treia a codonului din ARNm se află A, aceasta se poate împerechea cu U sau I, aflate în prima poziție a anticodonului. Tot astfel, G, din poziția a treia a codonului, se poate împerechea cu C și U, din prima poziție a anticodonului. Uracilul din poziția a treia a codonului se poate împerechea cu C, G și I, din prima poziție a anticodonului, iar citozina din poziția a treia a codonului se poate împerechea cu G și I, din prima poziție a anticodonului. Așadar, posibilitatea formării a patru perechi de baze A.I, U.I, C.I și G.I explică cum o singură moleculă de ARNt poate corespunde la mai mulți codoni din ARNm, ceea ce reprezintă în esență **degenerarea codului genetic**.

La drojdie (*Saccharomyces cerevisiae*) s-au descris două tipuri majore de ARNt pentru alanină. Cel secvențiat de Holley (1965) răspunde prin anticodonul său IGC, la codonii GCU, GCC și GCA. Este clar că doar inosina (I) se poate împerechea deopotrivă cu U, cu C și cu A. Să reținem convenția că denominalizarea codonului și anticodonului se face totdeauna cu terminalul 5' la stânga. Astfel, codonul 5' — GCU — 3' este împerecheat cu anticodonul 5' — IGC — 3', respectându-se însă, în condițiile împerecherii reale, antiparalelismul codon-anticodon.

Din tabelul de mai jos, rezultă clar natura *wobble* a împerecherii codon-anticodon:

Baza azotată din nucleotidul din poziția a 3-a a tripletei codonului (5'→ 3')	Baza azotată din nucleotidul aflat în prima poziție a tripletei anticodonului (3'→ 5')
A	U, I
G	U, U
U	G, I
C	G, I

Similar, cel de-al doilea ARNt pentru alanina (ARN_{tII}^{Ala}) răspunde doar la codonul GCG, ceea ce înseamnă că el are la anticodon secvența CGC.

Ipoteza *wobble* explică aranjamentul sinonimiilor în codul genetic.

Fiecare codon care începe cu A este redundant, ceea ce explică numărul de diferite molecule de ARNt care corespund la un anumit aminoacid.

Singurii codoni neredundanți, sunt codonii AUG pentru metionină și UGG pentru triptofan.

Nicicând un ARNt nu are la anticodon UUA, ACU și CUA și asta explică de ce codonii UAA, UGA și UAG sunt codoni stop.

La *Escherichia coli*, și probabil și la alte organisme, în poziția *wobble* (cea de-a treia poziție a codonului și prima poziție a anticodonului) a $ARNt^{Val}$ a fost descoperită o bază modificată numită acidul 5-oxiacetic uridina care se poate împerechea cu U, A și G. La alte organisme și la alte tipuri de ARNt, în anticodon, în poziția *wobble*, apare altă bază modificată și anume 2-tiouridina, care se împerechează numai cu A.

Prima bază în anticodon suferă deci modificare, ceea ce generează o specificitate în împerecherea de baze, fie mai mică, fie mai mare. Diferențele în prima poziție a diferiților anticodoni determină mai curând diferențe în numărul diferitelor molecule de ARNt ce corespund la un anumit aminoacid.

In concluzie:

- orice moleculă de ARNt citește fie unul, fie doi, fie trei codoni, numărul depinzând de faptul dacă prima bază a anticodonului, numită baza *wobble*, este C sau A modificată (1 codon), U sau G (2 codoni) sau o altă bază modificată (3 codoni). Redundanța codului genetic este cauzată, cel puțin în parte, de oscilarea (*wobble*) în împerecherea celei de a treia baze din codon.

Bazele modificate au apărut probabil în cursul evoluției, în poziția *wobble*, deoarece ele au maximalizat numărul codonilor care pot fi citiți de o singură moleculă de ARNt.

Stabilitatea oricărui tip de moleculă, fie ADN, fie ARN, ce constă din două trinucleotide complementare, este foarte mică. In cazul împerecherii codon-anticodon, mai mulți factori contribuie însă la conferirea stabilității legăturii anticodon-codon.

Aceștia sunt:

- plierea moleculei ARNt și compactarea buclei anticodonului de așa manieră încât bazele anticodonului sunt stocate și deci bucla anticodonului prezintă o mare stabilitate;
- în spatele părții 5' a anticodonului tuturor moleculelor de ARNt se află un U care sugerează că acesta este implicat în funcția anticodonului, probabil în interacțiunea codon-anticodon;
- codonul și anticodonul se împerechează, în mod normal, prin punți tranziente de hidrogen, atunci când, atât ARNt cât și ARNm sunt legați la ribozom, astfel ca legarea anticodonului la codon să fie optimizată.

4. ROLUL RIBOZOMILOR ÎN SINTEZA PROTEINELOR. *DECODIFICAREA MESAJULUI GENETIC*

Recunoașterea codonilor de către anticodonii corespunzători cade în sarcina aminoacil-ARNt-sintetazelor, deoarece acestea asigură încărcarea unui ARNt cu un aminoacid corespunzător, astfel ca anticodonul acestuia să recunoască pe principiul complementarității codonul determinator din ARNm specific anticodonului purtat de ARNt.

Ribozomii asigură potrivirea aminoacil-ARNt-urilor la codoni și asamblarea catenelor proteinice.

Ribozomul procariot are o subunitate mică (S) de 30S și o subunitate mare (L) de 50S. Unitatea ribozomală funcțională a acestui ribozom se constituie prin autoasamblarea acestor subunități pe molecula de ARNm și are o constantă de sedimentare de 70S.

În subunitatea 30S intră o singură moleculă de ARNr 16S de 1542 ribonucleotide și 21 tipuri de proteine ribozomale de tip S (de la *small*=mic). In subunitatea 50S intră o moleculă de ARNr 23S, de 2904 ribonucleotide, o moleculă de ARNr 5S, de 120 ribonucleotide și 34 tipuri de proteine de tip L (de la *large*=mare). Intre subunitatea mare și subunitatea mică se află mai multe puncte de contact, rezultând o adâncitură prin care trece molecula de ARNm în timpul translației (traducerii) mesajului genetic.

Ribozomul eucariot din citosol are o subunitate mică de 40S și o subunitate mare de 60S. Subunitatea mică conține ARNr 18S, de circa 1900 ribonucleotide și 30-35 proteine ribozomale de tip S, pe când subunitatea mare conține ARNr 28/25S, de 4800 ribonucleotide, o moleculă de ARNr 5,8S, de 160 ribonucleotide, o moleculă de ARNr 5S, de 120 ribonucleotide și 45-50 tipuri de proteine L.

In mitocondrii și cloroplaste se află ribozomi de tip diferit față de cei din citosolul celulei eucariote, ei fiind mai mici, având un număr mai mic de proteine ribozomale și cu molecule ARNr mai mici, uneori chiar și față de cele de la bacterii.

Sinteza proteinică se desfășoară în trei etape succesive: inițierea, elongarea și terminarea procesului. In etapa de inițiere are loc legarea subunității mici a ribozomului la ARNm și anume la o secvență specifică a acestuia care reprezintă situsul de legare a ribozomului, numit la procariote secvența *Shine-Dalgarno*. Această secvență precede cu câteva baze codonul de inițiere AUG, are o regiune bogată în purine și este recunoscută pe bază de complementaritate de către o secvență specifică de 5-8 nucleotide din ARNr 16S, parte constituientă a subunității mici a ribozomului. In procesul de atașare a subunității mici a ribozomului la ARNm și realizarea complexului de inițiere a translației, intervin factori proteinici de inițiere desemnați IF_1, IF_2, IF_3. Codonul de inițiere AUG din ARNm este situat într-o zonă în care se realizează o structură secundară a ARNm prin împerecheri intracatenare și această structură secundară facilitează recunoașterea unui asemenea codon de inițiere. Sechestrarea acestui codon de inițiere în structura secundară a ARNm poate conduce la blocarea procesului de inițiere.

De îndată ce s-a realizat această asociere ARNm — subunitate ribozomală mică, la un asemenea complex se atașează o subunitate ribozomală mare, constituind prin autoasamblare, unitatea ribozomală funcțională, activă în sinteza proteinică. Prin autoasamblarea moleculelor de ARNr (23S și 5S, la procariote și 28S; 5,8S și 5S la eucariote) cu proteinele ribozomale L, se diferențiază în subunitatea mare trei situsuri desemnate *A* (aminoacil), *P* (peptidil) și *E* (*exit* = ieșire). In situsul A intră ARNt încărcat cu aminoacidul corespunzător. In situsul P se realizează legăturile peptidice dintre aminoacizi, iar din situsul E iese din ribozom ARNt descărcat. Cât timp ribozomii nu sunt angajați în realizarea sintezei proteinice, ei există ca subunități separate, nefuncționale, în celulă. Ribozomul angajat în inițierea translației începe mișcarea de translație de la capătul 5' spre capătul 3' al moleculei de ARNm. Complexul format din subunitatea 30S — factori de inițiere și $ARNt^{fMet}$, reprezintă entitatea care recunoaște codonul inițiator AUG, din ARNm. La acest complex se atașează subunitatea 50S a ribozomului bacterian. De îndată ce ribozomul ajunge în dreptul codonului de inițiere AUG, din ARNm, este permisă intrarea directă în situsul P, a ARNt inițiator, purtător al Metioninei ($ARNt^{Met}$) la eucariote, respectiv al formilmetioninei ($ARNt^{fMet}$), la procariote. Este posibil ca Metionina să fie formilată posttranslațional. Acest ARNt inițiator are la anticodon secvența UAC. Când ribozomul, având în situsul P, ARNt inițiator, ajunge cu situsul A în dreptul următorului codon, aflat după codonul de inițiere, este permisă pătrunderea în situsul A a ARNt care recunoaște prin anticodonul său codonul din ARNm, corespunzător aminoacidului cu care este încărcat.

Spre deosebire de ARNt inițiator care intră în ribozom direct în situsul P, toate celelalte tipuri de ARNt, încărcate cu aminoacizi corespunzători, intră în ribozom, prin situsul A, în cadrul etapei de elongare a catenei polipeptidice. Factorii de elongație EF-Tu, EF-Ts și EF-G intervin în desfășurarea acestei etape. Ei reprezintă, de fapt, proteine ribozomale atașate între proteinele ribozomale L_7 și L_{12} care asigură interacția cu ribozomul a ARNt încărcat cu aminoacidul specific, pe de o parte, și deplasarea ribozomului pe ARNm, pe de altă parte.

Catenele polipeptidice sunt asamblate unidirecțional, începând de la terminalul amino spre terminalul carboxil, grupul carboxil al catenei polipeptidice în creștere fiind legat la grupul amino al următorului aminoacid.

Primul aminoacid (cel purtat de ARNt inițiator) este unit covalent, printr-o legătură peptidică, cu cel purtat cu ARNt, aflat în situsul A. Această legătură peptidică este formată pe când ambii aminoacizi sunt atașați la ARNt corespunzători. Formarea legăturii peptidice se realizează în situsul P al subunității mari a ribozomului, sub cataliza enzimei peptidpolimeraza. După formarea primei

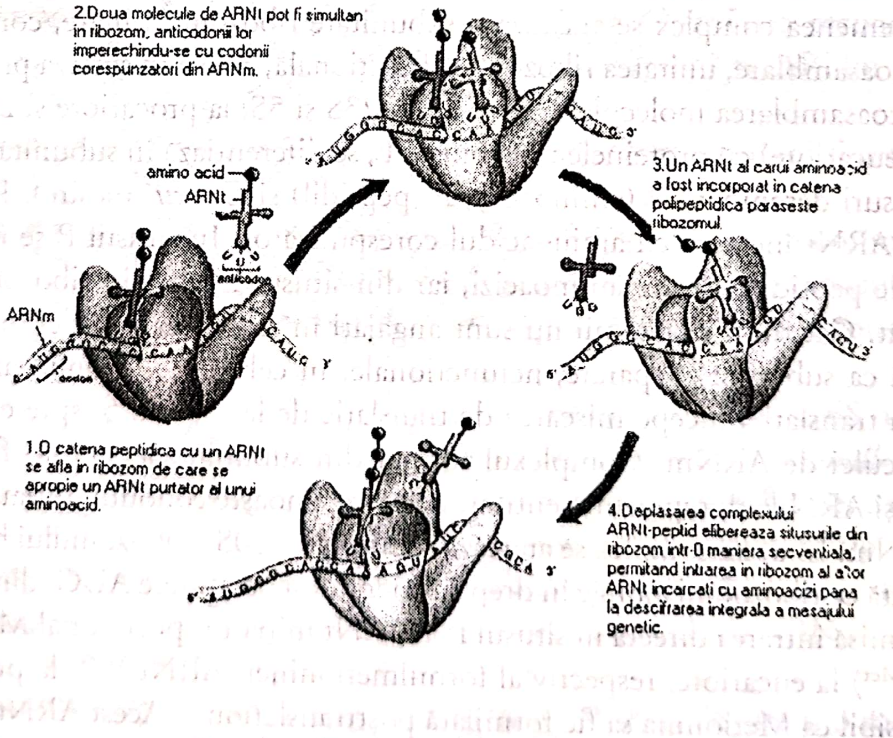

2.Doua molecule de ARNt pot fi simultan in ribozom, anticodonii lor imperechindu-se cu codonii corespunzatori din ARNm.
amino acid
ARNt
anticodon
ARNm
codon
3.Un ARNt al carui aminoacid a fost incorporat in catena polipeptidica paraseste ribozomul.
1.O catena peptidica cu un ARNt se afla in ribozom de care se apropie un ARNt purtator al unui aminoacid.
4.Deplasarea complexului ARNt-peptid elibereaza situsurile din ribozom intr-o maniera secventiala, permitand intrarea in ribozom al altor ARNt incarcati cu aminoacizi pana la descifrarea integrala a mesajului genetic.

Fig. 4 — Traducerea mesajului genetic.

legături peptidice, ARNt inițiator este scos din situsul P, care rămâne liber, și complexul aminoacil-ARNt din situsul A este translocat în situsul P, având primul aminoacid (Metionina) legat covalent (prin punte peptidică) la aminoacidul purtat de acest al doilea ARNt. Astfel, situsul A devine liber, iar ARNt, descărcat de metionină este translocat în situsul E, pe unde iese din ribozom. Pe când ribozomul se deplasează pe ARNm, pe o distanță corespunzătoare următorului codon, un alt complex aminoacil-ARNt, corespunzător acestui al treilea codon din ARNm, ocupă situsul A, devenit liber, ș.a.m.d. (fig. 4).

Acest proces continuă până ce un codon stop din ARNm ocupă situsul A, după care catena polipeptidică este eliberată din ribozom. După ce ribozomul a asigurat traducerea a circa 25 de codoni din ARNm, capătul 5' al ARNm devine liber spre a forma cel de al doilea complex de inițiere și un al doilea ribozom se angajează în traducerea mesajului genetic, spre a asigura sinteza unei a doua catene polipeptidice, apoi un al treilea, un al patrulea ribozom ș.a.m.d. se angajează în acest proces. Astfel, la un moment dat, pe una și aceeași moleculă de ARNm, se află angajați în traducerea mesajului genetic, purtat de aceasta, mai multe unități ribozomale, constituind ansamblul numit **polisom** sau **poliribozom** (fig. 5).

Fiecare ribozom individual din complexul polizomic poartă o catenă polipeptidică *in statu nascendi*, de o anumită lungime, depinzând de distanța la care ribozomul traducător de mesaj genetic s-a îndepărtat de terminalul 5' al ARNm. Când, în deplasarea sa pe molecula de ARNm, ribozomul ajunge cu situsul A în dreptul unui codon nonsens (codon stop sau codon terminator), în acest situs nu poate pătrunde nici un ARNt purtător de aminoacid, deoarece nu există

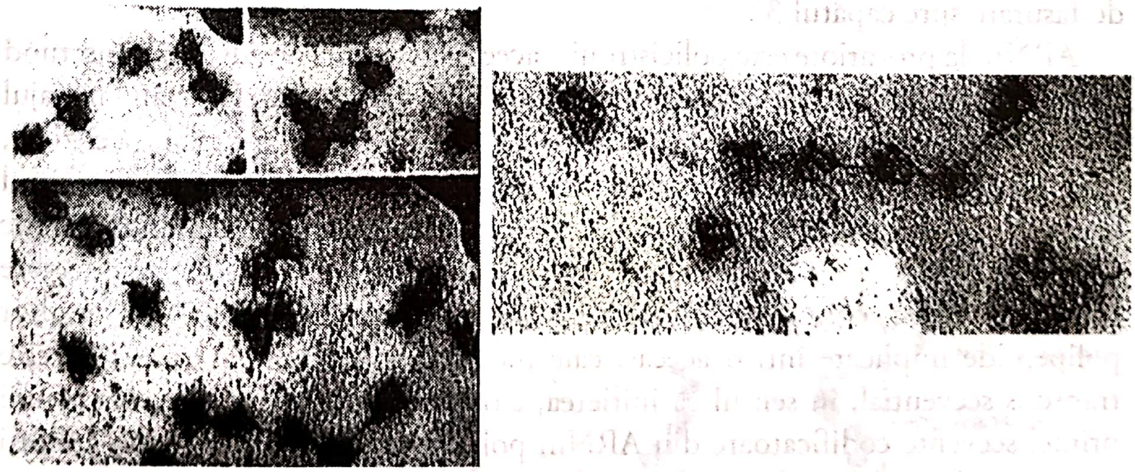


Fig. 5 — Poliribozomi din reticulocite colorați cu acetat de uranil și vizualizați la microscopul electronic. Ribozomii individuali sunt conectați prin intermediul ARNm (după A. Rich, din Herkowitz, 1977).

nici un anticodon care să recunoască complementar codonii UAA, UAG sau UGA și astfel are loc încetarea polimerizării de aminoacizi, adică stoparea sintezei catenei polipeptidice. In schimb, asemenea codoni terminatori sunt recunoscuți de către factorii de terminare numiți încă factori de eliberare, desemnați TF-R_1, TF-R_2, TF-R_3 sau RF_1, RF_2, RF_3. RF_1 eliberează catena polipeptidică ca răspuns la codonii stop (terminatori); RF_2 realizează același lucru ca răspuns la UAA și UGA, pe când RF_3 facilitează activitatea lui RF_1 și RF_2 care, interacționând cu ribozomul și codonul de terminare constituie complexul de terminare. Acesta, acționând enzimatic la nivelul situsului P, separă grupul carboxil al aminoacidului C-terminal de legătura sa cu ARNt, în urma unei reacții de hidroliză. TF-R rupe legătura esterificată a catenei polipeptidice cu ARNt final, aflat în situsul P, și astfel are loc eliberarea din ribozom a catenei polipeptidice și a ultimului ARNt, realizându-se în același timp și disocierea ribozomului în subunitățile sale componente, proces în care intervine și factorul de inițiere IF_3. In cadrul acestui proces de terminare a sintezei catenei polipeptidice intervin, pe o cale încă necunoscută, și proteinele ribozomale L_1 și L_{12}. Subunitățile ribozomale vor fi reciclate în următoarea rundă de translație a ARNm, asociindu-se într-o manieră randomizată, în sensul că o subunitate ribozomală mică, participantă într-o rundă de translație în asociere cu o subunitate ribozomală mare spre a constitui unitatea ribozomală funcțională, nu se va mai asocia tot cu aceeași subunitate ribozomală mare și viceversa.

La procariote, transcrierea mesajului genetic și traducerea sa pot avea loc simultan, deoarece, înainte de a fi terminată sinteza ARNm, capătul său 5', desprins de pe matrița ADN, se poate asocia cu ribozomii și are loc astfel inițierea traducerii sale într-o catenă polipeptidică (fig. 6, a și b), pe când transcripția este încă în desfășurare spre capătul 3'.

ARNm la procariote este policistronic, aceeași moleculă de ARNm transcriind informația genetică a tuturor genelor structurale ale operonului și purtând mesajul genetic pentru sinteza catenelor polipeptidice care, de regulă, intervin, ca enzime, într-o aceeași cale metabolică, așa cum este cazul operonului *lac* din genomul bacteriei *Escherichia coli*. In acest caz, organizarea ansamblului poliribozomic (polisomic) asigură traducerea simultană a mai multor mesaje genetice integrate într-o moleculă continuă de ARNm și coordinarea sintezei mai multor polipeptide implicate într-o aceeași cale metabolică. ARNm policistronic este transcris secvențial, în sensul că inițierea, elongarea și terminalizarea traducerii primei secvențe codificatoare din ARNm policistronic, sunt urmate de aceleași procese realizate la nivelul celei de a doua, a treia sau a patra ș.a.m.d. secvențe codificatoare. La terminarea traducerii primei secvențe codificatoare, ribozomii se pot disocia de pe ARNm și un nou complex de inițiere este asamblat la nivelul următoarei secvențe de inițiere, dar, în anumite condiții, ribozomul nu se disociază

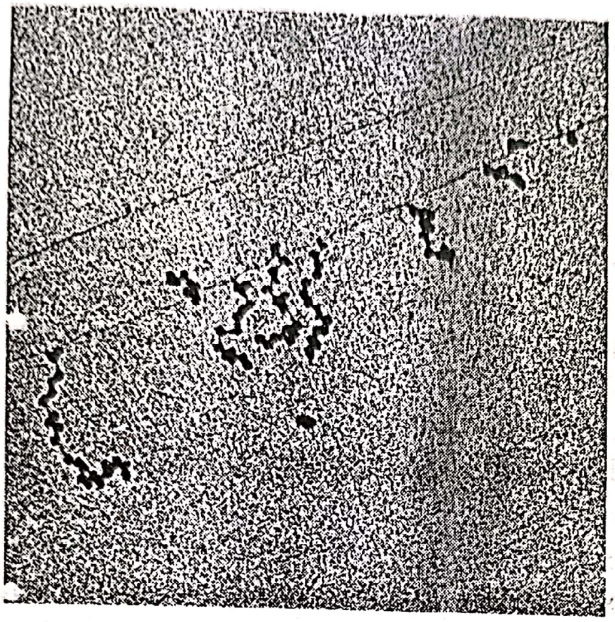


Fig. 6.a) — Imagine electronomicroscopică, mărită de 150.000 ori, a unui segment cromozomal activ al cromozomului bacteriei *Escherichia coli*, în timpul procesului de translație. Imaginea surprinde genele bacteriene „la lucru“, fiind transcrise în ARNm. Enzima ARN polimeraza este prinsă de matrița ADN (catena activă) în partea dreaptă ca o formațiune sferică, la nivelul situsului de inițiere a transcripției. Se remarcă un gradient al lungimii moleculelor de ARNm, din acest situs spre partea stângă jos, unde se află situsul de terminare a transcripției, la nivelul căruia moleculele de ARNm se desprind de pe matrița ADN. Încă pe măsură ce sunt sintetizate, (“*in statu nascendi*“), capătul 5’ al acestor molecule de ARNm se asociază cu ribozomii, spre a se realiza traducerea mesajului genetic, timp în care sinteza ARNm continuă spre capătul 3’.

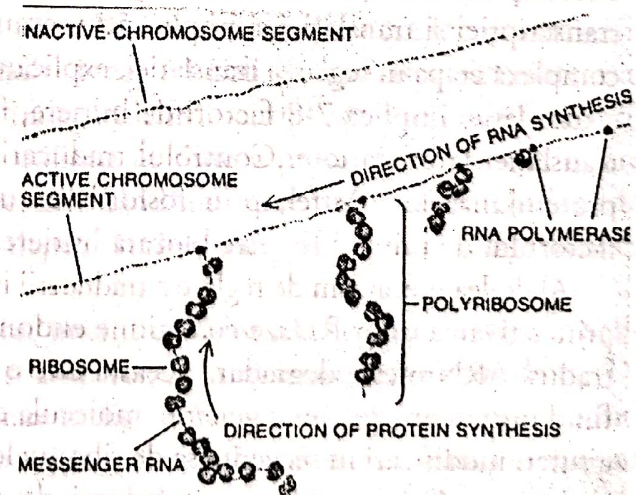

NACTIVE CHROMOSOME SEGMENT
DIRECTION OF RNA SYNTHESIS
ACTIVE CHROMOSOME SEGMENT
RNA POLYMERASE
POLYRIBOSOME
RIBOSOME
DIRECTION OF PROTEIN SYNTHESIS
MESSENGER RNA

Fig. 6.b) — Interpretarea schematică a electrografiei din figura 5 a, în care se vede asocierea mai multor ribozomi cu o aceeași moleculă de ARNm (poliribozomi) în procesul de translație. (după O.T. Miller, 1969).

de ARNm, ci migrează pe ARNm, spre a forma un nou complex de inițiere, la nivelul următoarei secvențe de inițiere.

Inițierea nu poate fi realizată de unități ribozomale, ci de subunități ribozomale. Din această cauză, după ce un ribozom a traversat întreaga catenă a ARNm și a asigurat sinteza unei catene polipeptidice, el trebuie să se dezasambleze, să se disocieze în subunitățile sale și acestea vor putea să se angajeze într-un nou ciclu de traducere, combinându-se, de această dată, cu subunități care au aparținut altor ribozomi. Se realizează astfel noi combinații de subunități ribozomale, la reluarea procesului de inițiere a traducerii. Disocierea subunităților ribozomale dintr-un ribozom, la încheierea activității sale de traducere a mesajului genetic se realizează prin intervenția factorului de inițiere IF-3, în conjuncție cu factorii de terminalizare.

La eucariote, transcrierea are loc în nucleu, iar traducerea are loc în citoplasmă, unde sunt cantonați ribozomii. ARNm trebuie, în consecință, să iasă din nucleu, în citoplasmă, la nivelul porilor anvelopei nucleare.

In sistemele de sinteză proteinică „*in vitro*", acelulare, ribozomii proveniți din celule aflate în interfază sunt mai activi în sinteza catenelor polipeptidice, față de cei proveniți din celule aflate în diviziune.

ARNm la eucariote este monocistronic, deoarece la acest grup de organisme genele nu sunt organizate în operoni, fiecare genă își are propriul său promotor și este transcrisă individual.

Există o specializare a ribozomilor în sinteza proteinică, la eucariote. Astfel, în hepatocite, ribozomii atașați la reticulul endoplasmic servesc la sinteza proteinelor serice, care vor fi excretate din celulă, pe când cei liberi servesc la sinteza proteinelor hepatice, care rămân în celulă.

Expresia genică la procariote este reglată în special la nivelul transcripției, pe când, la eucariote, aceasta este reglată la mai multe niveluri, incluzând cel al transcripției și translației și implicând mecanisme complexe de inițiere, cea mai complexă etapă în reglarea translației, explicându-se astfel de ce aparatul de inițiere a translației implică 7-8 factori de inițiere, față de 2-3 câți intervin în inițierea translației la procariote. Controlul traducerii la eucariote implică și intervenția proteinkinazelor. Astfel, prin fosforilarea uneia dintre cele 13 subunități ale factorului de inițiere IF_2 este blocată inițierea traducerii.

Al doilea mecanism de reglare a traducerii implică degradarea selectivă a ARNm, prin activarea unor RNaze cu acțiune endonucleazică. Astfel, de îndată ce a fost tradus, ARNm este degradat. Aceasta este o precauție luată de natură deoarece, fiind purtătoare de mesaj genetic, molecula de ARNm ar avea șanse mai mari de a suferi modificări în secvența sa de ribonucleotide, dacă ar avea o durată de viață mai mare. Ori, modificarea secvenței de ribonucleotide a ARNm înseamnă modificarea mesajului genetic, ceea ce are valoarea unei mutații la nivelul genei. Așa se explică de ce de îndată ce este descifrat mesajul genetic purtat de molecula de ARNm, aceasta este hidrolizată, celula utilizând molecule noi de ARNm pentru o proteină dată, când aceasta trebuie să fie sintetizată constitutiv. In cazul în care mesajul genetic trebuie să fie păstrat timp mai îndelungat (spori, semințe, ARNm pentru hemoglobină) molecula de ARNm este protejată prin asocierea cu proteine speciale, constituind complexe ribonucleoproteinice, denumite de către Spirin *informofere* sau *informosomi*. Există și unele aspecte particulare ale sintezei proteinice. Astfel, la bacterii, peretele celular conține pentapeptide care sunt sintetizate prin folosirea de ARNt, nu însă și de ribozomi. In sisteme acelulare de sinteză ("*in vitro*") ADN denaturat, ca și ADN monocatenar sintetizat pe cale chimică, ca de altfel și ADN monocatenar al fagului *fd*, pot acționa, în prezența neomicinei, ca ARNm, aceste molecule de ADN fiind traduse direct în polipeptide.

De aici, s-a dedus că în etapele inițiale ale biogenezei, relația ADN-proteină a fost directă, neimplicând intervenția mesagerului și adaptorului, dar ea avea mai curând un caracter aleatoriu, stohastic. Apariția ribozomilor, a mesagerului ARNm și a adaptatorilor ARNt, a însemnat constituirea unei mașinării de traducere sofisticate, dar de mare eficacitate și precizie. Așa se explică de ce mutațiile în genele ribozomale ca și în genele pentru ARNt sunt mutații „interzise". Când acestea apar, ele au un caracter letal, ceea ce conduce la moartea organismului purtător.

La cianobacterii (alge albastre-verzi) există granule de cianoficină, specifice acestui grup de procariote fotosintetizatoare. Ele apar ca granule mici, vizibile chiar și la microscopul optic, având formă globulară, poliedrică sau neregulat-sferoidală, cu diametru de 0,5-1μm. Ele reprezintă asocieri de lanțuri polipeptidice mari, ramificate, formate din doar doi aminoacizi: acidul aspartic, care formează un polimer linear, ca un „sâmbure", și arginina care apare ca resturi laterale. Cianoficina este o multi L-arginina-poli L-acid aspartic. Această proteină specială a cianobacteriilor nu este codificată în ADN, iar sinteza ei nu are loc în ribozom, ci direct, sub acțiunea enzimei multi L-arginil-poli (L-acid aspartic) sintetaza, utilizând cei doi aminoacizi aflați independent în citoplasmă. In cursul creșterii normale, cei doi aminoacizi sunt utilizați în sinteza proteinică normală, ce are loc în ribozomi. După încetarea creșterii, când sinteza obișnuită a proteinelor este oprită, acești doi aminoacizi sunt depozitați în polimeri de rezervă, reprezentați de granulele de cianoficină.

Există și cazuri speciale, în care, în sinteza unor antibiotice de natură polipeptidică, de către unele bacterii și ciuperci, sunt utilizați aminoacizi de tip D. Tot astfel, în condiții de transformare malignă, în sinteza proteinică sunt utilizați și asemenea izomeri optici ai aminoacizilor normali L, utilizați în sinteza proteinică normală, din toate sistemele biologice, de la bacterii la om.

Sinteza proteinică este un proces complex care are loc numai în celule. Proteinele virale sunt sintetizate de către mașinăria de traducere a celulei gazdă, pe baza mesajului genetic oferit de genomul viral.

5. DIVERSITATEA AMINOACIL-ARNt-SINTETAZELOR

Există cel puțin o ARNt-sintetază pentru fiecare aminoacid. Aceste enzime pot fi grupate în două clase, clasa I și clasa II, potrivit prezenței unor scurte secvențe ce le conferă identitate. Sintetazele pentru 10 aminoacizi ce aparțin setului de bază de 20 aminoacizi aparțin clasei I, iar cele pentru ceilalți 10 aparțin clasei II, așa cum rezultă din tabelul de mai jos:

Tabel cu clasificarea și structura subunităților aminoacil-ARNt sintetazelor de *E. coli.*

Clasa I	Clasa II
Arg (α)	Ala (α_4)
Cys (α)	Asn (α_2)
Gln (α)	Asp (α_2)
Glu (α)	Gly ($\alpha_2\beta_2$)
Ile (α)	His (α_2)
Leu (α)	Lys (α_2)
Met (α)	Phe ($\alpha_2\beta_2$)
Trp (α_2)	Ser (α_2)
Tyr (α_2)	Pro (α_2)
Val (α_2)	Thr (α_2)

Aminoacizii mai mici sunt activați în general de către sintetazele din clasa II, pe când cei mai mari și cei mai hidrofobi sunt activați de enzimele din clasa I. Enzimele din clasa II sunt mai vechi. Enzimele din clasa I acilează grupul 2'-OH al adenozinei terminale a ARNt, pe când enzimele clasei II, cu excepția celei pentru fenilalanină, acilează grupul 3'-OH. Domeniul de activare a aminoacidului al enzimelor din cele două clase este diferit. Enzimele din clasa I au un domeniu β paralel (plierea de legare a dinucleotidului clasic), pe când enzimele din clasa II au un domeniu antiparalel.

Aminoacil-ARNt sintetazele sunt înalt selective in recunoașterea lor atât a aminoacidului ce urmează a fi activat, cât și a ARNt acceptor. Există un proces de corecție a citirii sau de editing, care face ca frecvența erorilor de încărcare a ARNt in vivo să fie de 1 la 3000. Sintetazele își corectează propriile erori. Valina greșit activată nu este transferată la ARNt specific pentru izoleucină, ci acest ARNt promovează hidroliza valin-AMP și astfel previne încorporarea sa eronată în proteine. Hidroliza eliberează astfel sintetaza spre a activa și transfera izoleucina, aminoacidul corect. Situsul hidrolitic este destul de mare spre a adăposti valina-AMP, dar el este prea mic spre a permite intrarea izoleucinei-AMP.

Cum pot sintetazele să facă distincția dintre valină și treonină, aminoacizi care sunt foarte asemănători dimensional? Alegerea între acești aminoacizi are la bază faptul că treonina diferă de valină numai prin aceea că ea are un -OH în locul grupului CH3. Aminoacil-ARNt sintetaza pentru valină conține două situsuri catalitice adiacente, unul pentru acilarea ARNt și celălalt pentru hidroliza unui ARNt greșit acilat. Valina este preferabilă treoninei în reacția de acilare, deoarece situsul de acilare este hidrofob. Dimpotrivă, treonil-ARNt este hidrolizat mult mai rapid decât valil-ARNt, deoarece situsul hidrolitic este hidrofil. Sintetaza pentru valină realizează cea mai mare parte a procesului de editare la nivelul aminoacil-ARNt, pe când cel pentru izoleucină realizează acest lucru la nivelul aminoacil-AMP.

Cele mai multe aminoacil-ARNt sintetaze conțin situsuri hidrolitice, pe lângă situsuri de acilare. Perechi complementare de situsuri funcționează ca dublă sită spre a asigura înalta fidelitate a încărcării. Situsul de acilare respinge aminoacizii care sunt mai mari decât cel corect, deoarece spațiul este prea mic pentru ei, pe când situsul hidrolitic distruge intermediarii activați care sunt mai mici decât cei corecți. Corecția hidrolitică a citirii este un mecanism central pentru fidelitatea multor aminoacil-ARNt sintetaze, ca și pentru ADN polimeraze.

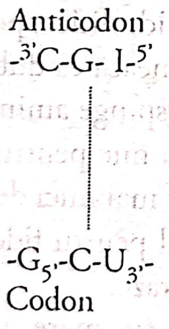
Sunt unele aminoacil-ARNt sintetaze care realizează cu mare precizie discriminarea între tirozină și fenilalanină. Grupul hidroxil din inelul tirozinei îi dă capacitatea să se lege la enzimă de 10^4 ori mai puternic decât o face fenilalanina.

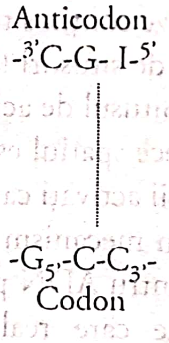
Sintetazele recunosc cu mare precizie bucla anticodonului și tulpina acceptoare din moleculele de ARNt. Determinantul crucial al acestei recunoașteri este prezența unei perechi G⌉U din poziția 3:70 din tulpina acceptoare a moleculei acestui ARNt pentru alanină care are 76 nucleotide. ARNt pentru cisteină diferă de ARNt pentru alanină în 40 de poziții și conține o pereche C⌉G, în poziția 3:70. Dacă experimental, această pereche C⌉G este înlocuită cu G⌉U, ARNt^{Cys} va fi recunoscut de alanil-ARNt sintetaza ca și când ar fi ARNT^{Ala}. Un „microhelix" de 24 dintre cele 76 nucleotide ale ARNt nativ este specific aminoacilat de sintetază. Acest microhelix conține doar brațul acceptor 3' și o buclă *hairpin*.

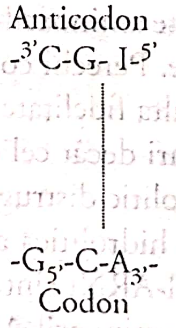
Identitatea altor ARNt-uri este conferită de către alți determinanți. De exemplu, atât anticodonul, cât și brațul acceptor al ARNt^{Gln} sunt recunoscute de glutaminil-ARNt sintetaza. Sintetazele de clasă I, alungite, interacționează cu ARNt pe întreaga lungime a L-ului macromoleculei acestuia, de la anticodon la capătul acceptor 3'. Enzima aspartil-ARNt sintetaza, care aparține clasei II, se leagă la o față a ARNt ce se întinde de la anticodon la capătul 3'. Totuși, părți diferite ale ARNTt sunt recunoscute de către aceste enzime.

Aminoacidul atașat ARNt nu joacă nici un rol în selectarea codonului, ci codonul este recunoscut de anticodonul din ARNt. Unele molecule de ARNt recunosc mai mulți codoni din ARNm, datorită împerecherii de baze de tip „*wooble*“.

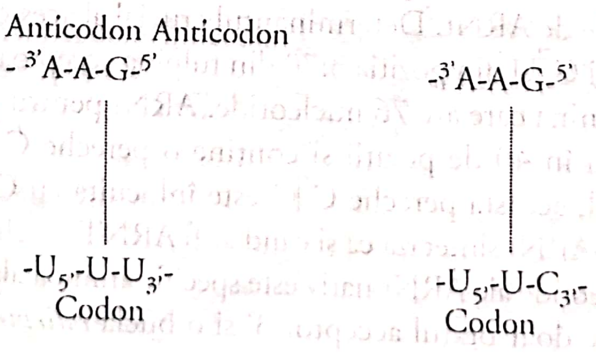
Prima bază a anticodonului	A treia bază a anticodonului
C	G
A	U
U	A sau G
G	U sau C
I	U, C sau A


Anticodon
-$^{3'}$C-G- I-$^{5'}$
-G$_{5'}$-C-U$_{3'}$-
Codon


Anticodon
-$^{3'}$C-G- I-$^{5'}$
-G$_{5'}$-C-C$_{3'}$-
Codon


Anticodon
-$^{3'}$C-G- I-$^{5'}$
-G$_{5'}$-C-A$_{3'}$-
Codon

ARNt pentru fenilalanina, care are anticodonul GAA, recunoaște codonii UUU sau UUC, nu însă și codonii UUA și UUG.


Anticodon Anticodon
- $^{3'}$A-A-G-$^{5'}$
-$^{3'}$A-A-G-$^{5'}$
-U$_{5'}$-U-U$_{3'}$-
Codon
-U$_{5'}$-U-C$_{3'}$-
Codon

Prima bază din anticodon determină dacă o moleculă dată de ARNt citește 1, 2 sau 3 codoni: C sau A (1 codon); U sau G (2 codoni) sau I (3 codoni). Astfel, o parte din degenerarea codului genetic derivă din **imprecizia** (wooble) în împerecheri între cea de a treia bază a codonului și prima bază a anticodonului.

Inozina (I) apare frecvent în anticodonii ARNt-urilor. Ea maximalizează numărul de codoni ce pot fi citiți de către o anumită moleculă de ARNt.

6. DECODIFICAREA ȘI FENOMENUL DE SUPRESIE A MUTAȚIILOR

Termenul de *supresie* a fost introdus în anul 1920, de către colaboratorul lui Morgan, Sturtevant, spre a desemna restaurarea sau repararea fenotipică parțială sau completă a unei funcții alterate prin mutație a genotipului. Fenomenul are la bază apariția de mutații supresoare, localizate într-o altă genă, adică într-o genă diferită de aceea în care s-a produs mutația inițială (originală). In acest caz, se vorbește de *supresie intergenică*. Supresia mai poate fi consecința apariției mutației într-o genă ce codifică pentru unele componente ale aparatului de traducere, cum ar fi în genele pentru ARNt (și în acest caz iau naștere ARNt supresori ai mutației genice) și în genele pentru proteinele ribozomale, implicate în asigurarea (controlul) fidelității traducerii. Există și *supresie intragenică* determinată de apariția mutațiilor supresoare într-o aceeași genă în care a apărut mutația primară. Aceasta a doua mutație, apărută într-o genă care anterior a suferit o primă mutație, cauzează o alterare adițională a genei în cauză, tradusă într-o alterare suplimentară a proteinei specificate care, deja mutantă fiind, poate să i se compenseze funcția alterată original (metaforic vorbind: „cui pe cui se scoate“), permițând formarea unei structuri proteinice terțiare care are funcția restaurată.

In anul 1932, Bridges a introdus termenul de *mutație de supresie*, spre a desemna o a doua mutație ("mutație într-un situs secundar“) care restabilește total sau parțial o funcție pierdută, datorită unei mutații secundare, localizată într-un situs mutațional, diferit de cel al mutației primare.

Mutația de supresie nu trebuie confundată cu *mutația de reversie*, deoarece ea nu determină reversarea, înlăturarea mutației primare. Mai mult, în cazul mutației supresoare, restabilirea fenotipului original este doar parțială, tranzientă, ea nedeterminând o reparare genotipică completă, adică o înlăturare totală și definitivă a mutației originale, așa cum se întâmplă în cazul mutației de reversie.

Mutațiile supresoare apar în părți distincte în organisme dublu-mutante și astfel ele pot fi separate de mutațiile originale, prin recombinare genetică.

Deosebit de interesante sunt fenomenele de supresie ce au la bază molecule modificate în urma mutației în genele codificatoare pentru diferite tipuri de ARNt, dând naștere la molecule modificate de ARNt care se numesc **ARNt supresori.**

Dintre mutațiile supresoare, mutațiile supresor-sensibile se comportă precum tipul sălbatic, atunci când în celulă sunt prezente molecule supresoare. De exemplu, s-a descris o mutantă fagică care poate crește intr-o anumită linie (tulpină) de bacterie, dar nu si în alta. Această bacterie care permite reproducerea fagului mutant a fost desemnată Sup$^+$.

Mutațiile sensibile la supresor sunt de două tipuri principale și anume *mutații nonsens* sau *terminatoare ale catenei* și *mutații de sens greșit* sau de substituție de baze.

Mutațiile terminatoare ale catenei sunt foarte comune, deoarece ele pot apare pe căi multiple. De exemplu, schimbarea unei singure baze azotate în codonii din ADN care devin în ARNm normal codonii AAG, CAG, UCG, UAC si UAU poate genera codonul terminator de catenă denumit codonul amber — UAG. Dacă o asemenea mutație are loc la nivelul secvenței genice, atunci va fi dirijată sinteza unei proteine mutante care va avea o funcție alterată sau va fi nefuncțională, deoarece nu există nici o moleculă de ARNt care să aibă la anticodon secvența CUA prin care să recunoască complementar codonul UAG. Astfel, in locul unei proteine normale, de o anumită lungime, va fi sintetizat doar un fragment din acesta, dar care nu poate îndeplini o funcție normală, cu excepția faptului dacă mutația nu se realizează foarte aproape de capătul carboxil al proteinei.

La anumite mutante bacteriene, o mutație terminatoare de catenă nu determină terminalizarea. Să considerăm o bacterie B care a suferit o mutație ce determină terminarea catenei la situsul **tyr** în gena lac, astfel că bacteria este genotipic *lac*$^-$. Dacă dorim să obținem un reversant *lac*$^-$ al bacteriei B, prin mutagenizarea unei populații B, va trebui să creștem această populație bacteriană, timp de mai multe generații și apoi să transferăm cultura pe un mediu selectiv pentru codonii lac+. In asemenea condiții, vom întâlni trei clase de revertanți ai mutației terminatoare de catenă, potrivit schemei de mai jos:

ARNm Tip sălbatic	AUG	UAC	UAA	UAC	UAA
Tip sălbatic de proteină		Met	Tyr	Tyr Revertant clasa I de tip sălbatic UCG	
					UAA
Reversie					
ARNm mutant				Ser Revertant clasa II Mutație silențioasă	
				UAG	UAA
Proteina majoră				ARNt Lis+ AAG mutant care răspunde la codonul UAG	
				Lys Revertant clasa III Mutație supresată	

Clasa I de mutație terminatoare este reversată printr-o mutație de substituție de bază azotată care convertește UAG spre UAC. In acest caz , catena proteinică va fi completată, **Tyr** va fi restabilită in poziția corectă si proteina va avea secvența de aminoacizi de tip normal. Cu alte cuvinte, va fi o reversie perfectă, completă, spre tipul sălbatic. In clasa II, in catena polipeptidică, de altfel completă, va fi un nou aminoacid (Ser), dar secvența aminoacizilor va fi oricum diferită de tipul sălbatic. In acest caz, mutația de terminalizare a catenei va fi convertită spre o mutație silențiată care are un fenotip de tip sălbatic sau aproape de tip sălbatic. Acest lucru este rezultatul unei mutații de substituție care convertește UAG in UCG, codonul **Ser**, si deci va avea loc înlocuirea Tyr cu Ser care nu alterează marcant funcția proteinei, Ser fiind un aminoacid acceptabil in acea poziție a proteinei.

Clasa III de revertanți produce o catenă polipeptidică completă, de obicei prin adăugarea unui aminoacid la situsul mutant, fără a altera secvența de baze care a suferit inițial mutația, codonul rămânând UAG. Celula a dobândit capacitatea de a ignora (deci, de a supresa, in termeni științifici, genetici) mutațiile terminatoare ale catenei de tip UAG, astfel că, pe o cale oarecare, codonul mutant, devenit in

Desemnare genetica		
Curentă	Veche	Codonul supresat
Sup 1 sau sup I	Sup D	UAG
Sup 2 sau sup II	Sup E	UAG
Sup 3 sau sup III	Sup F	UAG
Sup 4	Sup C	UAA
Sup 9	—	UGA
Sup B	—	UAA
Sup B	Sup L	UAA

sine codonul terminator UAG, este tradus intr-un aminoacid, in catena polipeptidică.

7. ARNt SUPRESORI NONSENS

Explicația moleculară pentru fenomenul de supresie, descris mai sus, este aceia că revertanții de clasă III, care se numesc mutante supres sau bacterii ce conțin supresori, posedă o moleculă alterată de ARNt — una care are anticodonul CUA, capabil să se împerecheze cu UAG.

Acest ARNt mutant se numește ARNt supresor.

ARNt este produsul unei gene ARNt. Printr-o eroare de replicare sau de reparare are loc înlocuirea unei baze azotate în secvența genică pentru ARNt. Astfel, prin mutație, molecula de ARNt^{Lys} al cărei anticodon este în mod obișnuit CUU a fost alterată, anticodonul său devenind CUA care se poate împerechea prin punți de hidrogen cu codonul UAG. Există cel mult opt molecule de ARNt, având un anticodon complementar care, prin schimbarea unei singure baze, poate supresa codonul terminator UAG.

Următorii aminoacizi, ai căror codoni sunt indicați in paranteză, pot fi puși la situsul unui codon stop: Lys (AAG), Gln (CAG), Glu (CAG), Ser (UCG), Trp (UGG), Leu (UUG), Tyr (UAC sau UAU). Acești codoni ai aminoacizilor corespunzători pot fi alterați prin mutație, spre a deveni codon stop UAG sau UAA, (în cazul lui UAU).

Există supresori pentru mutantele de terminare a catenei de tip ocru (UAA) și opal (UGA).

Acești supresori sunt molecule mutante de ARNt ai căror anticodoni sunt alterați, prin schimbarea unei singure baze.

In notarea convențională, supresorii sunt desemnați prin simbolul **Sup**, urmat de un număr sau ocazional de o literă, spre a se distinge un supresor de altul. O celulă lipsită de supresor este desemnată **Sup**^{0} sau **Sup**$^-$.

Iată supresorii de *E. coli*:

Desemnare genetica		
Curentă	Veche	Codonul supresat
Sup 1 sau sup I	Sup D	UAG
Sup 2 sau sup II	Sup E	UAG
Sup 3 sau sup III	Sup F	UAG
Sup 4	Sup C	UAA
Sup 9	—	UGA
Sup B	—	UAA
Sup B	Sup L	UAA

Nu oricare supresor UAG poate restaura o proteină funcțională, prin supresia mutației nonsens UAG, de terminare a catenei. Astfel, un codon UAG produs prin mutația codonului Leu (UUG), ar putea fi supresat de un ARNt supresor care inseră Tyr, Ser, sau Trp, dar ar putea să nu fie capabil de a tolera o substituție cu un aminoacid încărcat electric, precum Lys, Glu sau Gln.

Supresia poate fi incompletă. In primul rând, înlocuirea Leu, Tyr sau Ser poate restaura suficient de mult activitatea pentru supraviețuire, dar activitatea poate fi subnormală, deoarece aminoacizii aceștia nu sunt hidrofobi. In al doilea rând, codonul nonsens este de obicei tradus ca un codon sens, de către un ARNt supresor, numai câteodată, adică terminarea catenei este destul de frecventă, astfel că se realizează o concentrație mai scăzută a proteinei respective, față de tipul sălbatic.

Un supresor **ocru**, supresează, de asemenea, codonul **amber**, dar un supresor **amber** nu supresează totdeauna un codon **ocru**. Aceasta este o consecință a oscilației (*wobble*) împerecherii codon — anticodon. Un supresor **ocru** (*UAA*) trebuie să aibă anticodonul UUA. Deoarece G.U apare ca o pereche *wobble*, interacțiunea lui UUA cu UAG (**amber**), este posibilă, cu formarea perechii G.U, în poziția a treia, care este poziția *wobble* tipică. Un supresor **amber** (*UAG*) poate avea anticodonii CUA sau UUA. Anticodonul UUA se poate împerechea cu **ocru** (UAA), dar CUA nu poate realiza această împerechere, astfel că mutantele **ocru** sunt supresate de supresorii **amber**.

O celulă poate supraviețui prezenței unui supresor numai dacă ea conține două sau mai multe copii ale genei pentru ARNt. Este clar că dacă o moleculă de ARNt^{Ser} care citește codonul UCG este modificată în urma mutației, atunci codonul UCG nu mai poate fi citit ca un codon sens, ci ca unul nonsens. Aceasta va conduce la terminarea catenei polipeptidice, oriunde apare codonul UCG. O celulă care poartă un asemenea ARNt mutant nu va fi capabilă de a realiza sinteza nici unei molecule proteinice. Totuși, există copii multiple ale celor mai multe gene pentru ARNt. In plus, există, de asemenea, molecule minore de ARNt care au aceiași anticodoni ca și moleculele majore. Astfel, în orice celulă vie care conține un ARNt supresor, va fi totdeauna o copie adițională a ARNt de tip sălbatic, ce poate funcționa în traducerea normală. Excepție de la acest caz general este molecula $ARNt^{Trp}$ de la *E. coli*, existând o singură copie genică pentru acest ARNt, astfel că un supresor **amber** care inseră triptofanul nu este posibil într-o bacterie obișnuită. Interesant, din diploizii parțiali, în care a doua copie a genei pentru $ARNt^{Trp}$ este conținută într-un plasmid F', s-au putut izola supresori **amber** ce inseră triptofan. Acest supresor are proprietatea deosebită de a permite inserția de glutamină ca și de triptofan. Explicația constă în aceea că schimbarea anticodonului în mutantă alterează ușor recunoașterea de către glutamil-ARNt-sintetaza care ocazional acilează molecula de $ARNt^{Trp}$ Glutamina.

Unele molecule de ARNt pot suferi mutație spre a da fie supresor **amber**, fie supresor **ocru**. De exemplu, $ARNt^{Trp}$, care are anticodonul QUA (Q derivă de la **queosină**, care este o bază modificată) poate suferi mutație spre CUA, caz în care devine un supresor **amber** (UAG) și spre UUA, devenind supresor **ocru** (UAA). Deși supresia terminalizării catenei este un rezultat tipic al mutației anticodonului, ea poate fi rezultatul unei alterări oriunde în alt loc al moleculei ARNt. De exemplu, la supresorul **opal sup 9**, schimbarea unei baze în tulpina DHU alterează pe o cale oarecare specificitatea legării codon-anticodon. Acest supresor este unul deosebit de interesant, de vreme ce este o alterare a moleculei de $ARNt^{Trp}$ care se află doar într-un singur exemplar. Este clar că este necesar un mecanism care să permită traducerea codonului triptofanului, pentru ca o celulă care conține **sup 9** să poată supraviețui. De fapt, **supresorul sup 9** păstrează capacitatea de a răspunde la codonul triptofanului, adițional codonului UGA. Mai mult, el nu recunoaște codonul UGA, cu prea mare eficiență (el este așa-numitul supresor-slab), dar, totuși, recunoașterea se realizează cu o rată suficientă, spre a permite completarea unei proteine prematur terminate, la un nivel adecvat supraviețuirii.

De ce este capabil **supresorul sup 9** de a răspunde atât la codonul UGG, cât și la codonul UGA, cu același anticodon, nu se cunoaște.

Posibil, alterarea tulpinii DHU afectează orientarea moleculei de ARNt pe ribozom și produce împerechere ambiguă între codon și anticodon.

8. TERMINAREA NORMALĂ ÎN PREZENȚA UNUI ARNt SUPRESOR

Dacă o celulă conține un supresor **amber**, atunci proteinele care se termină prin interpunerea unui singur codon UAG nu vor fi complete și existența unui ARNt supresor va fi letală. Această situație poate fi evitată prin două mijloace:

– factorii proteinici activi în terminație răspund la codonii pentru terminarea catenei, chiar dacă este prezentă o moleculă de ARNt care recunoaște acest codon, adică chiar dacă supresia este stabilă. De exemplu, dacă probabilitatea recunoașterii este numai de X procente, doar X procente din proteinele mutante, prematur terminate, vor fi complete, și numai X procente din proteinele care se termină normal vor fi terminate în absența terminării;

– terminarea normală a catenei poate utiliza perechi de codoni de terminare, distincți, precum secvența UAG-UAA. Astfel, existența unui UAG supresor nu ar permite terminarea la o proteină dublu terminată. Supresia mutațiilor potențial letale UAG și UGA este foarte eficientă.

Duplicarea codonilor de terminare a catenei se pare că se întâlnește frecvent la multe organisme. Dar, este clar că terminarea catenei este asigurată cel mai comun de codonul UAA, ceea ce este în acord cu constatarea că supresorii UAA sunt în mod tipic foarte ineficienți, prevenind terminarea în codonii UAA reciproc induși între 1 și 5%. Mai mult, celulele care conțin supresori UAA sunt în general nesănătoase, cresc destul de încet față de cele lipsite de supresori sau care conțin supresorii UAG sau UGA. Este clar că factori încă necunoscuți trebuie că intervin în terminarea normală a catenei, printre ei putând fi structura secundară a ARNm precum și caracteristici particulare ale ribozomilor care reduc recunoașterea semnalelor naturale de recunoaștere de către supresori.

Există numeroase situații de mutații de terminare slabă a catenei în sensul că apare un codon UAG în interiorul secvenței codificatoare a genei, în cadrul corect de citire, la care terminarea nu apare întotdeauna.

In jargon de laborator, se spune că apare o săritură a citirii la nivelul situsului mutant. In plus, mutațiile în proteinele ribozomale uneori cresc eficiența terminării mutațiilor slabe. Spre a explica creșterea bacteriilor ce conțin supresor, s-a făcut propunerea că tripletele terminatoare joacă un rol mic sau chiar nu joacă vreun rol în terminarea naturală a catenei, dar asemenea ipoteză a fost exclusă de observarea că schimbările de baze într-un codon natural de terminare a catenei abolește terminarea. De exemplu, o schimbare U—C în hemoglobină, la nivelul codonului stop UAA, determină inserția unei glutamine în acel situs și adiția a încă 30 de aminoacizi la terminalul carboxil al catenei polipeptidice, până ce este creat un alt codon stop. Astfel, dacă terminarea necesită informație, alta decât prezența unui codon UAA, acea informație nu este prin ea însăși suficientă spre a permite ca terminarea să aibă loc.

Supresia mutațiilor nonsens poate avea loc în unele sisteme. De exemplu, o proteină în care valina (nepolară) a fost înlocuită cu acidul aspartic (polar), pierde activitatea; funcția acestei proteine poate fi restabilită, dacă are loc o supresie *missense*, în care alanina (nepolară) înlocuiește acidul aspartic (polar). O asemenea substituție poate avea loc pe trei căi:

- molecula mutantă de ARNt poate recunoaște doi codoni, posibil printr-o modificare în bucla anticodonului;
- molecula mutantă de ARNt poate fi recunoscută de o aminoacil-sintetază necognată și astfel este greșit acilată;
- sintetaza mutantă poate încărca o moleculă ARNt necognată.

Supresia mutațiilor *missense* este în mod necesar insuficientă. Dacă un supresor care substituie acidul aspartic cu alanina a lucrat cu o eficiență de 20%, atunci, virtual, în fiecare moleculă de proteină produsă de celulă, cel puțin un acid aspartic va fi înlocuit, ceea ce face ca celula să nu poată supraviețui. Frecvența obișnuită a supresiei *missense* este de circa 1%. Supresorul *missense* care inseră glicina la un codon AGA are o eficiență de 25%. Totuși, codonul AGA nu apare foarte frecvent, astfel că efectul nociv asupra proteinelor normale este minim. In acest fel, o cantitate mică de proteină funcțională, dar esențială, este realizată și deci celula mutantă este capabilă să supraviețuiască. Dar, supresia *missense* determină totuși apariția unui număr semnificativ de proteine deficiente de toate tipurile, astfel că celula purtătoare a unei mutații supresoare *missense* crește de regulă încet, fiind în general nesănătoasă. Asemenea celule au ca principiu: *„e mai bine să fii bolnav, decât să fi murit.“*

Un anticodon alterat poate produce un supresor *missense* fără a afecta specificitatea cu care sintetaza cognată încarcă molecula de ARNt. Un exemplu bine studiat este acela al ARNt^{Gly}. Există trei forme ale acestei molecule desemnate I, II și III, fiecare purtând un anticodon diferit: moleculele I și II au anticodonii CCC (traduce codonul Glicinei) și UCC (împerechindu-se cu GGA și prin oscilare (*wobble*) cu GGG). Deoarece, atât $\text{ARNt}_{\text{I}}^{\text{Gly}}$ cât și $\text{ARNt}_{\text{II}}^{\text{Gly}}$, răspund la GGG, $\text{ARNt}_{\text{I}}^{\text{Gly}}$ poate fi alterat în anticodon, fără ca celula să piardă capacitatea de a citi GGG. S-a izolat o mutantă $\text{ARNt}_{\text{I}}^{\text{Gly}}$ la care anticodonul este schimbat de la CCC (Gly), la CCU (Arg). Aceasta este o mutantă supresoare *missense*. Ea este acilată cu glicina care este inserată la AGG ce reprezintă un codon pentru arginină. Molecula de ARNt este una minoră, în majoritatea cazurilor AGG este citit însă ca arginina. Totuși, ocazional, este citit ca glicina și aceasta poate restabili funcția unei proteine, având o arginină la un situs mutant. Supresia ar fi deosebit de eficientă dacă situsul argininei a apărut prin alterarea unui situs care inițial a codificat glicina. Se cunosc multe exemple de supresori *missense*, apăruți pe această cale.

9. SUPRESIA *MISSENSE* PRIN ÎNCĂRCAREA ERONATĂ

Schimbări de baze unice în tulpina (ramura) acceptoare (regiunea dublu-catenară a ARNt care are la terminalul 3'-OH, situsul acceptor de aminoacid), ca și în câteva alte situsuri, cresc frecvența de încărcare incorectă, realizată de sintetaze. De exemplu, asemenea schimbări de câte o singură bază azotată, în șase poziții din ramura acceptoare a ARNt^{Tyr}, de *E. coli*, stimulează încărcarea eronată ocazional cu glutamină de către glutamil-ARNt-sintetaza.

Misacilări (încărcări eronate cu aminoacizi activați) ale ARNt sunt produse și de schimbările de baze din anticodon. De exemplu, molecula de ARNtI^{Tyr}, din **sup 3**, este încărcată primar cu tirozina, dar schimbarea anticodonului face să fie recunoscut codonul UAG, stimulând misacilarea ocazională cu glutamina.

Până în prezent, nu au fost identificate ARNt sintetaze care să cauzeze misacilarea unui ARNt, de la tipul sălbatic de *E. coli.*, dar, s-a constatat că la *sub 3*, ocazional, are loc încărcarea ARNtI^{Tyr} cu glutamina, cauzată de o glutamil-ARNt-sintetază mutantă, ceea ce sugerează că vor putea fi identificate în viitor și alte sintetaze mutante care realizează încărcarea eronată.

10. SUPRESORI *FRAMESHIFT (DE SCHIMBARE A CADRULUI)*

Când apare o mutație frameshift, de exemplu o adiție de baze, toți codonii din aval sunt citiți incorect (se schimbă secvența normală de codoni) și întreaga secvență de aminoacizi din proteina ce urmează situsului de mutație este incorectă. Nu există cale ca un represor *missense* sau *nonsens* să poată permite sinteza unei proteine active. Restaurarea activității este posibilă numai prin crearea cadrului original de citire.

La bacterii apar trei tipuri de revertanți spontani ai mutațiilor frameshift (mutațiile cadrului de citire). Cel mai important tip este acela în care baza adăugată este pur și simplu eliminată. Un al doilea tip este un supresor intragenic de situs secund, în care fie o bază vecină este eliminată, fie două baze suplimentare sunt adăugate. In ambele cazuri, cadrul de citire este restabilit și câtă vreme pot fi tolerați aminoacizii adiționali între situsurile mutante și revertante, activitatea proteinei este posibilă. Uneori, acest tip de reversie necesită prezența unui supresor de terminare a catenei. Cel de al treilea tip de reversie este produs de un supresor adecvat extragenic, reprezentând molecule mutante de ARNt, având un anticodon din patru litere (patru baze în loc de trei). Un exemplu de asemenea supresor este un ARNt^{Gly} mutant în care bucla anticodonului posedă un rest C suplimentar, anticodonul conținând secvența CCCC. Este posibil ca aceasta să permită împerecherea cu o secvență de patru resturi G sau cea de a patra bază să nu fie angajată în împerechere, ci să reprezinte mai curând un spațiator care forțează ca următorul codon citit să fie îndepărtat cu o bază.

Deleții de baze singulare sunt de asemenea intragenic supresibile, posibil datorită faptului că unele molecule de ARNt se pot împerechea cu numai două baze ale codonului. Această ipoteză derivă din faptul că aproape toate mutațiile de deleție de baze singulare sunt oarecum slabe, posibil deoarece variate molecule de ARNt normal se pot angaja ocazional (sau probabil totdeauna ?) în împerecheri de câte două baze, nu de trei, cum este în general considerată împerecherea codon-anticodon. Totuși mecanismul supresiei frameshift este puțin înțeles.

11. SUPRESORI TERMOSENSIBILI — *SENSIBILI LA TEMPERATURĂ (TS)*

O colecție de supresori Ts ai mutațiilor *amber,* analizate minuțios, a permis să se constate că aceștia pot supresa mutațiile *amber,* la 30°C, dar nu și la 42°C. De reținut că aceștia nu sunt supresori ai mutațiilor termosensibile.

Majoritatea acestor supresori sensibili la temperatură sunt molecule ARNt la care a fost alterată ramura acceptoare, ceea ce permite ca ARNt să sufere schimbări semnificative în forma sa, la 42°C.

Sinteza unei proteine ce conține o mutație *amber* se desfășoară normal la 30°C, într-o bacterie ce are un supresor Ts. Totuși, sinteza poate fi imediat stopată, mai curând prin ridicarea temperaturii, numărul de molecule funcționale depinzând de temperatură. Pot exista și mutații care amplifică supresia (*sue*), active asupra supresorilor termoinsensibili, crescând eficiența supresiei de 3-10 ori. Astfel, mutațiile *sue A*, *sue B* și *sue C* realizează amplificarea supresiei de 3,3 ori (*sue A*), de 10 ori (*sue B*) și de 3,3 ori (*sue C*), dublu-mutanții *sue A sue B* și *sue B sue C* amplificând supresia de 13,3 și, respectiv, de 27 de ori. Nu este cunoscut mecanismul molecular al mutațiilor *sue.*

Utilizarea supresorilor de drojdie în cercetările pe celule animale este o problematică de actualitate.

S-au izolat celule mutante animale, dar puține reprezintă mutante de terminare a catenei, deoarece nu s-au izolat încă din celule animale supresori. Dar, ARNt amber supresor, purificat de la drojdie, a fost injectat cu ajutorul unei microseringi în celule individuale mutante de mamifere. Pentru unele mutații, perioada de supresie durează câteva ore. In cele din urmă, ARNt de drojdie este distrus și, deoarece în aceste celule nu se sintetizează acest ARNt supresor, fenotipul mutant revine. Această tehnică a permis identificarea mutantelor amber la mamifere.

REGLAREA ACTIVITĂȚII GENICE LA PROCARIOTE

1. INTRODUCERE

Reglarea expresiei genice este o necesitate pentru supraviețuirea sistemelor biologice. Una dintre căile de reglare a fluxului de informație genetică (expresia genică) este reprezentată de variația eficienței de recunoaștere a promotorului de către ARN polimerază, precum și variația în inițierea translației. Numărul de molecule ale unei proteine produse în unitatea de timp sub direcția unei anumite gene diferă în funcție de numeroși factori.

Cantitatea de proteine și, în special, de enzime nu este constantă în timp.

Din totalul celor 2000-4000 catene polipeptidice diferite pe care le poate sintetiza o celulă bacteriană și care reprezintă capacitatea permanentă de codificare a cromozomului bacterian, într-un moment dat al ciclului celular, unele se află în cantitate mare, altele se află în cantitate mică.

Dacă proteinele *structurale* ale peretelui celular, ale membranei celulare și ale ribozomilor se află nu numai în cantitate mare, dar și relativ constantă, în celulă, proteinele *enzimatice* variază cantitativ între 1 și 10 molecule, până la 500.000 molecule per celulă, în diferite etape ale ciclului de viață, ceea ce înseamnă că genele care codifică pentru aceste proteine nu funcționează permanent.

De aici, rezultă necesitatea existenței unor mecanisme care să condiționeze intrarea și ieșirea din activitate a diferitelor gene. Acestea sunt mecanisme de reglaj genetic, de modulare a expresiei genice, intuite de multă vreme, dar descifrate abia în anii 1960-1961.

Selecția naturală, acționând din momentul realizării variației genetice în sistemele biologice și funcționând după principiul eroare-eliminare, avantaj selectiv păstrare-generalizare, a avut ca rezultat, în decursul evoluției sistemelor biologice, maximalizarea eficienței acțiunii sale. S-au diferențiat două căi principale pentru ca o celulă să devină mai eficientă:

- să dezvolte un proces nou care necesită mai puțină energie liberă;
- să poate elimina pierderile.

Mecanismele de reglaj genetic se înscriu în general pe cea de a doua cale, a evitării consumului inițial de materie și energie, condiționând sinteza unui produs genic atunci, acolo și în cantitatea de care celula are nevoie, în orice moment dat al evoluției sale. La procariote funcționează mecanismele de reglaj genetic de tip „da sau nu" și au în general aspect de modulare cantitativă. O asemenea activitate de tip „tot sau nimic", respectiv „da sau nu" se realizează prin reglarea transcrierii, adică fie prin a permite, fie prin a bloca sinteza ARNm.

Activitatea genică în sistemele biologice este reglată în primul rând la nivelul transcripției. Nu se cunosc exemple de scoatere totală din funcție a unui sistem dat. Chiar și atunci când mecanismul de reglaj este în poziția „NU", totuși mai rămâne un nivel bazal de expresie genică care permite unul sau două evenimente de transcriere genică per generație celulară și, în consecință, sinteza proteinică, e drept, foarte redusă. Modularea cantitativă este deci variabilă, presupunând sinteza în cantități diferite a produsului genic, de la foarte bogată, la parțială sau cea mai mică, la foarte redusă, dar foarte rar se înregistrează nivelul zero.

Sistemele bacteriene se caracterizează prin MODULARE COORDONATĂ prin care multe enzime ce intervin succesiv în aceeași cale metabolică sunt sintetizate coordonat, utilizându-se mesaje genetice aflate în aceeași moleculă de ARNm care este în consecință un ARNm policistronic.

Un alt tip de modulare a activității biosintetice într-o celulă bacteriană este cel al inhibiției prin feedback sau inhibiție prin produs final (efect Novick-Szilard), în cadrul căruia produsul reacției metabolice, atingând un anumit nivel cantitativ (o anumită concentrație), intervine în stoparea propriei căi metabolice, la nivelul primei etape a acesteia.

Există două tipuri fundamentale de reglaj al transcripției: reglaj negativ și reglaj pozitiv.

În reglajul negativ este prezent în celulă un inhibitor care blochează inițierea transcripției. Pentru a contracara acțiunea inhibitorului trebuie să intervină un antiinhibitor sau un INDUCTOR.

În reglajul pozitiv are loc activitatea promotorului prin intervenția unei molecule efectoare sau EFECTOR care poate fi o proteină, o moleculă mică sau o moleculă complexă.

Cele două tipuri de reglaj genetic nu se exclud reciproc, unele sisteme biologice fiind deopotrivă pozitiv sau negativ reglate, necesitând două tipuri de reglatori.

În sistemele catabolice (degradative) acționează fie reglajul pozitiv, fie cel negativ. Într-o cale metabolică biosintetică, produsul final al acestei căi reglează adesea negativ propria sa sinteză, absența produsului încurajând sinteza, pe când prezența produsului inhibă sinteza sa.

Reglajul genetic a fost pentru prima dată descifrat la procariote și anume la bacteria **Escherichia coli**. Teoria reglajului genetic a fost enunțată în anul 1961, de către geneticienii francezi Fr. Jacob și Jaques Monod, autori ai lucrării: „*Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins*", apărută în J. Mol. Biol. 3:318.

Teoria se bazează în principal pe descoperirea de către J. Monod, în anul 1941, a fenomenului de **diauxie**: când **E. coli** este crescută pe un mediu de glucoză și lactoză, bacteria utilizează mai întâi glucoza, până ce o epuizează. Urmează o perioadă de stagnare a creșterii bacteriei, după care iar începe creșterea, de data aceasta utilizând lactoza, ca subtrat nutritiv. Când bacteria este crescută pe mediu fără lactoză, în celulă se află doar o moleculă de β-galactozidază — enzimă care desface lactoza spre a fi catabolizată. Când bacteria este crescută pe mediu cu lactoză, în celulă se sintetizează circa 3000 de molecule de β-galactozidază. Este clar că bacteria sintetizează enzima doar atunci când în celulă a apărut substratul nutritiv, sau a trecut la folosirea unui nou substrat, care este și substrat enzimatic pentru enzima ce reprezintă produsul genei care intră în activitate. Fenomenul de DIAUXIE presupune că atunci când celula bacteriană utilizează glucoza, în ea vor fi transcrise (vor funcționa) genele care dețin informația pentru sinteza enzimelor ce intervin în metabolizarea glucozei și nu vor funcționa (vor fi represate, deci nu vor putea fi transcrise) genele care dețin informația genetică pentru sinteza enzimelor ce metabolizează lactoza. Când glucoza a fost epuizată, va avea loc un proces invers: represia genelor ce determină sinteza enzimelor pentru metabolizarea glucozei și intrarea în funcție (inducția) genelor ce dirijează sinteza enzimelor pentru metabolizarea lactozei. Ca urmare, trebuie să existe un mecanism care să regizeze această intrare și scoatere din funcție a genelor. Acesta este MECANISMUL REGLAJULUI ACTIVITĂȚII GENICE.

Descifrarea mecanismelor de reglaj genetic a fost facilitată de descoperirea a sute de mutante **lac⁻** care sunt incapabile de a utiliza lactoză în calitate de sursă de carbon. Prin manipulări genetice „clasice" (utilizând conjugarea bacteriană, sex-ducția) unele din aceste mutații au fost trecute din cromozomul de **E. coli** în plasmidul recombinant **F'lac**, acest fator de sex F recombinant (F') fiind purtătorul genelor pentru utilizarea lactozei (lac). S-au construit diploizi parțiali F' lac^-/lac^+ sau F'lac^+/lac^-. S-a constatat că acești diploizi parțiali (doar genele care dirijează sinteza enzimelor ce intervin în metabolizarea lactozei — genele lac — se află în dublu exemplar, toate celelalte gene aflându-se într-un singur exemplar, așa cum este în general cazul la procariote, unde există un singur cromozom, un singur grup de linkage, fiecare genă fiind reprezentată în cromozom printr-o singură copie) aveau un fenotip Lac$^+$, adică erau capabili de a sintetiza β-galactozidaza și deci de a utiliza lactoza, ca sursă de carbon.

Testele de complementație au dovedit că toate mutantele izolate inițial se încadrau în două grupe desemnate **lacZ** și **lacY**. Existența a două grupe de complementație a dovedit că în sistemul genetic **lac** există cel puțin două gene.

Experiențele în care celulele de **E. coli** au fost supuse la lactoză marcată cu izotopul radioactiv al carbonului ^{14}C au arătat că materialul radioactiv nu poate intra într-o celulă **y**$^-$, pe când un mutant **z**$^-$ poate încorpora lactoză marcată radioactiv. Tratamentul celulelor *y*$^-$ cu lizozim-enzima ce distruge parțial peretele celular, făcându-l foarte penetrabil, dă posibilitatea unei celule **y**$^-$ să încorporeze lactoză marcată cu ^{14}C. Din această experiență s-a dedus că gena *y* dirijează sinteza unui produs care este implicat în transportul lactozei din mediu în interiorul celulei bacteriene, fiind deci o moleculă cărăuș. Alte asemenea experiențe au dovedit că gena **z** este gena structurală pentru β-galactozidază. Cartarea genetică a dovedit că genele **y** și **z** sunt dipuse adiacent, în cromozomul bacterian.

S-a dovedit experimental că atunci când o cultură de **E. coli** de tip sălbatic (normal) **lac**$^+$ este crescută pe un mediu lipsit de lactoză, concentrațiile intracelulare de β-galactozidază și permează sunt foarte scăzute și anume 1 sau 2 molecule per celulă. Dacă însă în mediul de cultură este prezentă și lactoza, concentrațiile celor două enzime sunt înalte, de ordinul a 1% din cantitatea totală a proteinelor celulare de circa 10^5, per celulă. Când, la un mediu fără lactoză și fără glucoză, pe care se află o cultură de **E. coli** lac$^+$, se adaugă lactoză, se constată că cele două enzime β-galactozidază și permează sunt sintetizate simultan. S-a dedus, pe de o parte, că sistemul lactoză este inductibil și că lactoza este INDUCTOR, iar pe de alta, că genele pentru cele două enzime sunt transcrise simultan, intrând ca părți componente în alcătuirea unei unități de transcriere.

Hibridizarea ARNm marcat cu ^{32}P, la diferite momente după adăugarea lactozei, cu ADN obținut printr-un fag hibrid λ lac (ADN al fagului λ are inserat operonul lac) a arătat că adiția lactozei accelerează sinteza ARNm lac.

Inducția sintezei enzimelor ce intervin în metabolizarea lactozei este studiată, nu utilizând ca inductor lactoza (care fiind totodată substrat nutritiv ar fi permanent clivată de β-galactozidază), ci analogi ai lactozei, ce conțin sulf, precum isopropiltiogalactozidul (IPTG) și tiometilgalactozidul (TMG) care sunt inductori eficienți, fără a fi și substraturi pentru β-galactozidază. Ei sunt deci **inductori „gratuiți“**.

S-au izolat mutanți de **E. coli** care realizează ARNm lac, și deci sintetizează β-galactozidază și permează, deopotrivă în prezența și în absența unui inductor. Asemenea mutanți dereglați s-au numit MUTANȚI CONSTITUTIVI.

Jacob și Monod, utilizând asemenea mutanți constitutivi, au construit o varietate de celule parțial diploide și au constatat că asemenea mutante sunt de două tipuri desemnate $\mathbf{i}^-$ și $\mathbf{o}^C$. Mutantele $\mathbf{i}^-$ se comportă precum mutantele „-“ ale celor mai multe gene și sunt recesive. S-a dedus că gena i este o genă reglatoare al cărei produs este un inhibitor. Mutantele $\mathbf{i}^-$ nu au inhibitorul și astfel devin constitutive. Jacob și Monod au denumit produsul genei **i** REPRESORUL LAC. Descoperirea mutantelor de terminare a catenei de tip amber, în gena **i**, a demonstrat că represorul lac este o proteină. În anul 1967 a fost purificat represorul lac. Experiențele de cartare genică au permis localizarea genei **i** adiacent genei **z**, stabilindu-se totodată ordinea genelor **izy**.

Mutantele o^C s-au dovedit a fi dominante, condiționând sinteza constitutivă a β-galactozidazei, numai atunci când o^C și z^+ se află pe aceeași moleculă de ADN. Un test imunologic capabil de a detecta o mutantă β-galactozidazică a arătat că enzima mutantă este sintetizată constitutiv, într-un diploid parțial $o^Cz/\ o^+z^+$, pe când enzima de tip sălbatic se sintetizează doar când se adaugă un inductor între genele **i** și **z**, astfel că ordinea genetică a celor patru elemente ale sistemului lac este **i o z y**. Aceste observații au permis lui Jacob și Monod să tragă concluzia că mutațiile o^C definesc un situs sau o regiune necodificatoare din ADN, mai curând decât o genă (mutațiile în genele codificatoare trebuie să fie complementabile, pe când mutațiile în o^C nu sunt complementabile). Această regiune **o** condiționează dacă sinteza produsului genei adiacente **z** este de tip inductibil sau de tip constitutiv. Această regiune **o** s-a numit OPERATOR.

2. MODELUL OPERON. OPERONUL *LAC* AL BACTERIEI *EPCHERICHIA COLI*

OPERONUL ESTE O UNITATE DE ORGANIZARE ȘI DE EXPRESIE COORDONATĂ A GENELOR AI CĂROR PRODUȘI INTERVIN ÎNTR-O ACEEAȘI CALE METABOLICĂ.

Transcrierea coordonată a genelor dintr-un operon este blocată de *proteine supresoare* și activată de *proteine stimulatoare*

1. Produșii genelor **z** și **y** sunt codificați într-o singură moleculă de ARNm policistronic. Există a treia genă desemnată **a** care codifică enzima transacetilază care catalizează acetilarea restului de galactoză din molecula dizaharidului lactoză. Mutantul a^- metabolizează normal lactoza, fiind deci $\mathbf{Lac}^+$. Aceasta înseamnă că transacetilarea nu este direct implicată în metabolismul lactozei.

2. Promotorul moleculei de ARNm policistronic este imediat adiacent regiunii **o**. Secvența este recunoscută în mod specific de către subunitatea σ a ARN

polimerazei. Aceasta se asociază intim cu promotorul, atunci când gena structurală trebuie să intre în funcțiune și începe deplasarea sa spre genele structurale pe care le transcrie, având astfel loc sinteza unui ARNm policistronic. Trecerea ARN polimerazei peste regiunea operatoare este condiționată de starea acesteia din urmă.

Mutațiile promotorului (p^-) fac ca mutanții rezultați să fie complet incapabili de a sintetiza atât β galactozidaza cât și permeaza. Ele apar în segmentul de ADN dintre **i** și **o**.

3. Starea operatorului este dependentă de asocierea sau neasocierea sa cu represorul.

4. Represorul este o proteină reglatoare cu proprietăți alosterice, prezentând două situsuri, unul cu afinitate (alosterie) pentru secvența de nucleotide a regiunii operatoare și altul prezentând proprietăți de recunoaștere și deci afinitate pentru inductor (lactoza). Prezența sau absența substratului nutritiv determină starea activă sau inactivă a represorului. În stare activă, represorul manifestă afinitate pentru regiunea operatoare, se cuplează cu ea și face ca aceasta să fie blocată sau închisă, stare care nu mai permite trecerea ARN polimerazei. Astfel, neputând fi transcrise, genele structurale nu pot funcționa. Când însă represorul este în stare inactivă, regiunea operatoare este în stare deblocată sau deschisă, permițând accesul ARN polimerazei la genele structurale.

5. Inductorii stimulează sinteza ARNm prin legarea la represor. Această cuplare a inductorului la represor alterează structura tridimensională a represorului, ceea ce face ca represorul să nu se mai poată lega la operator. Astfel, în prezența unui inductor, operatorul rămâne neocupat, iar promotorul devine disponibil pentru inițierea sintezei ARNm.

Acest model al operonului explică caracteristicile sistemului lac și ale altor sisteme genetice reglate negativ.

Modelul operon însă nu poate explica două anomalii:

1. Inductorii trebuie să penetreze o celulă spre a se lega la moleculele represoare, dar transportul inductibil necesită inducție. Cum pătrund întâi inductorii în celulă? Sunt posibile două explicații: mai întâi o oarecare cantitate de inductor poate intra în celulă fără acțiunea permeazei, sau o oarecare cantitate de permează este sintetizată fără a fi necesar inductorul. S-a dovedit că cea de a doua alternativă este cea reală.

Un paradox aparent a apărut atunci când s-a arătat mai târziu că lactoza, care este o glucoză-1,4- galactoză, nu se leagă la represor, astfel că adevăratul inductor este izomerul lactozei numit alo-lactoză (glucoză-1,6- galactoză) totuși, alo-lactoza este realizată din lactoză prin acțiunea catalitică a β-galactozidazei, astfel că, inducția sintezei β-galactozidazei prin lactoză necesită ca β-galactozidaza să fi fost deja prezentă. Ambele aceste aparente anomalii au aceeași explicație: în stare neindusă a operonului **lac**, există totuși o mică cantitate de ARNm **lac** sintetizat anterior prezenței lactozei, și anume, câte o moleculă de ARNm per celulă, per generație. Aceasta se numește sinteza consitutivă de bază sau bazală și ea are loc, deoarece legarea represorului la operatorul lac nu este niciodată infinit de puternică. Odată pe generație celulară, chiar dacă represorul se leagă foarte puternic la operator, ocazional el se desprinde de pe aceasta și în acea clipă în care și promotorul este liber, ARN polimeraza poate iniția transcripția.

Moleculele de lactoză sunt transportate în celulă cu ajutorul unei molecule de permează. Câteva molecule de alo-lactoză sunt realizate din lactoză cu ajutorul β-galactozidazei. Alo-lactoza se prinde de represorul cuplat cu operatorul. Acest represor, devenit inactivat, se desprinde de pe operator și permite astfel, prin eliberarea operatorului, accesul ARN-polimerazei la genele structurale **z**, **y** și **a**, spre a fi transcrise. Începe sinteza ARNm și producerea a sute de mii de molecule de β-galactozidază și permează.

Represorul este produs continuu, dar la o rată scăzută, astfel că atunci când există suficientă alo-lactoză, celula este menținută în stare derepresată. Glucoza rezultată din clivarea lactozei este utilizată ca sursă de carbon și energie. Galactoza rezultată din această clivare a lactozei este convertită tot în glucoză, prin intervenția unui set de enzime a căror sinteză este de asemenea inductibilă. Sistemul inductibil în care galactoza devine inductor se numește **operonul gal**.

În cele din urmă, este consumată toată lactoza, atât din mediul de cultură, cât și din celulă. În consecință, sinteza represorului care s-a desfășurat neîntrerupt, face ca acum, în absența lactozei, concentrația represorului activ să crească, depășind la un moment dat pe aceea a alo-lactozei și astfel să fie reinstalată represia.

La bacterii, majoritatea moleculelor de ARNm au o durată de viață de numai câteva minute, astfel că, în mai puțin de o generație celulară, rămâne prea puțin ARNm lac și sinteza β-galactozidazei și permeazei încetează. Aceste proteine sunt destul de stabile, dar concentrația lor se diluează gradat, pe măsură ce celulele se divid. Când lactoza s-a adăugat la mediul de cultură, doar după o generație după ce lactoza inițială fusese epuizată, clivarea lactozei nou adăugate începe imediat, deoarece celulele au deja o cantitate suficientă de permează și β-galactozidază, pentru a realiza acest proces.

Etapa cea mai importantă în verificarea principalelor ipoteze ale modelului operonului a fost izolarea represorului **lac** și demonstrarea proprietăților sale pe care le așteptaseră oamenii de știință.

Acest lucru s-a realizat, utilizând capacitatea de legare a IPTG radioactiv la proteina represoare.

S-a dovedit că represorul **lac** constă din patru subunități proteinice identice, fiecare având o secvență de 347 aminoacizi și fiecare putând lega o moleculă de IPTG.

Mutantele i^- nu dau posibilitatea realizării de complexe represor-IPTG, deoarece ele sunt lipsite de represor.

Represorul purificat s-a dovedit a se lega la operator.

Legarea represor-operator s-a evidențiat prin utilizarea analizei pe filtre de nitroceluloză. S-a constatat astfel că represorul se leagă la operator la tipul normal de bacterie, dar nu și la mutantele o^C, iar IPTG blochează această legare a represorului la operatorul normal, ceea ce a reprezentat o confirmare exactă a celor afirmate de modelul operonului.

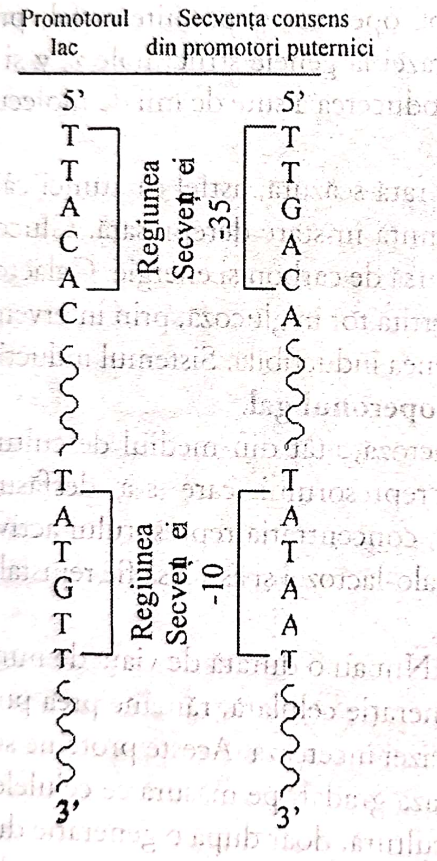


Fig. 1. — Diferența dintre secvența consens a operonului lac și operonilor puternici în regiunea secvenței −35 și a secvenței −10 la *E.coli*. Pentru exprimarea optimă a operonului lac este necesară intervenția complexului cAMP-CAP (modificat din Stryer, 1995).

Când este prezentă glucoza în mediu, nu se poate sintetiza ARNm **lac** și deci nu are loc sinteza de β-galactozidază, până ce nu este epuizată toată glucoza. Explicația acestui proces ar fi aceea că glucoza previne inactivarea represorului, de către inductor, sau că, pentru sinteza ARNm **lac**, mai este necesar și altceva decât înlăturarea represorului. Această din urmă alternativă s-a dovedit a fi cea corectă. Glucoza s-a dovedit a avea efect inhibitor asupra sintezei enzimelor catabolice precum β-galactozidaza, galactozidaza, arabinoza și triptofanaza, reducând concentrația de cAMP din celulă. Adăugarea de cAMP exogen la mediul de cultură anulează acțiunea represivă a glucozei, stimulând inițierea concertantă a transcripției multor operoni inductibili. Dacă în celulele de mamifere cAMP acționează prin stimularea unei proteinkinaze care fosforilează multe proteine țintă, precum cele care controlează sinteza și hidroliza glicogenului, la bacterii, cAMP se leagă la proteina CAP — stimulatoare a genelor în catabolism. Proteina CAP este un dimer cu două subunități identice de 22Kda, fiecare având un domeniu de legare la ADN și un domeniu de legare la cAMP. Complexul CAP–cAMP stimulează transcripția, prin legare la anumite situsuri ale promotorului. În operonul lac, CAP se leagă în nemijlocita vecinătate a situsului de legare a ARN polimerazei (între –48 și –51) anume între –87 și –49. Legarea CAP și legarea ARN polimerazei la ADN se potențează reciproc, deoarece ambele proteine pliază duplexul ADN într-o aceeași direcție.

Toți promotorii operonilor catabolici inductibili la care se leagă complexul cAMP-CAP· conțin secvența TGTGA în amonte de promotor, aceasta reprezentând partea esențială a situsului de legare a CAP. Acești promotori prezintă secvențele –35 și –10 cu diferențe semnificative față de secvența consens a promotorilor puternici (fig. 1).

Operonii controlați concertant de AMP ciclic fac parte dintr-un circuit reglator global. O rețea asemănătoare este reprezentată de genele de șoc termic (care sunt activate de o subunitate sigma distinctă a ARN polimerazei, indusă de creșterea temperaturii) precum și de genele implicate în sistemul de reparare SOS.

Efectul inhibitor al glucozei asupra expresiei operonului **lac** este indirect. Un mutant de **E. coli**, incapabil de a converti glucozo-6-fosfatul în următorul intermediar din cursul glicolizei, poate fi indus cu IPTG să sintetizeze ARNm **lac**, chiar dacă glucoza este prezentă. Astfel, nu glucoza ca atare, ci un catabolit al glucozei inhibă sinteza ARNm **lac.** Din această cauză, efectul glucozei s-a numit **represia catabolitului.** Termenul este totuși incorect, deoarece în cadrul procesului nu se utilizează un represor.

În anul 1957, Earl Sutherland a descoperit substanța numită AMP ciclic sau cAMP (fig. 2) și a constatat că ea se întâlnește în toate celulele animale. AMP ciclic este sintetizat din ATP cu ajutorul enzimei **adenilciclază.**

La organismele eucariote, pluricelulare, cAMP joacă un rol important în acțiunea multor hormoni. Dar această substanță este întâlnită și la **E. coli** și concentrația sa este reglată de metabolismul glucozei. Într-o cultură bacteriană flămânzită de o sursă de energie (incubată într-un mediu de cultură care nu conține o sursă de carbon), concentrația intracelulară de cAMP este foarte mare. Dacă cultura de bacterii este pusă pe un mediu care conține glucoză, concentrația de cAMP este foarte scăzută.

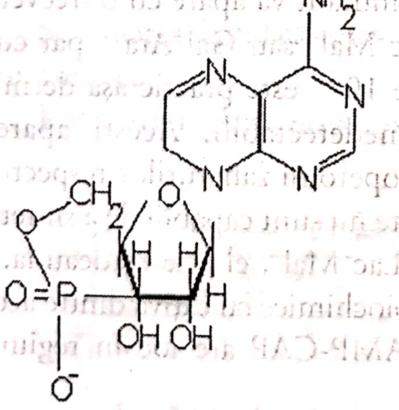


Fig. 2. — Adenozinmonofosfatul ciclic (cAMP).

Dacă mediul conține glicerol sau oricare altă sursă de carbon, care însă nu poate intra în calea glicolitică, concentrația cAMP este, de asemenea, înaltă.

Explicația pentru aceste constatări ar fi că un oarecare metabolit glucozic se află între glucozo-6-fosfat și punctul de intrare a glicerolului în calea glicolitică sau un produs format din acest metabolit, pe o oarecare cale, este un inhibitor al adenilciclazei — enzima care convertește AMP în cAMP. Semnificația acestor rezultate este că cAMP este un modulator al activitații operonului **lac**.

Ca și alte bacterii, **E. coli** conține o proteină numită proteina activatoare a catabolitului (CAP) care este codificată de gena **crp** și care formează un complex cu cAMP. Mutațiile care apar, fie în gena **crp**, fie în gena pentru adenil ciclază, fac ca celula să nu poată sintetiza ARNm **lac**.

Complexul cAMP-CAP este activ în sistemul lac. Cerința pentru intervenția acestui complex în funcționarea operonului lac este independentă de sistemul de represie, de vreme ce mutantele cu mutații în genele pentru **crp** și pentru ciclază sunt incapabile de a sintetiza ARNm **lac**, chiar în condițiile în care ele apar și la mutantele de tip constitutiv i^- și o^C.

Complexul cAMP-CAP trebuie să fie legat la o secvență de baze din ADN, în regiunea promotorului, spre a putea să fie inițiată transcripția. Astfel, cAMP-CAP este un reglator pozitiv, în contrast cu represorul și operatorul **lac** care sunt independent reglate, atât pozitiv cât și negativ.

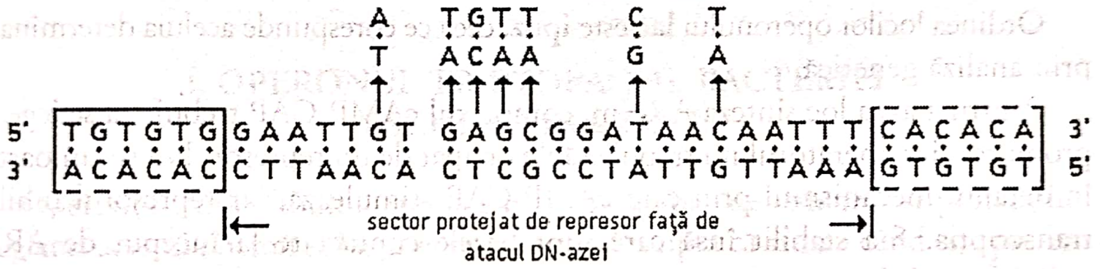
Și alte zaharuri, precum galactoza, maltoza, arabinoza și sorbitolul sunt convertite în glucoză, sau în unii intermediari din glicoliză, în cursul degradării lor. Enzimele responsabile de metabolismul acestor zaharuri sunt sintetizate de operoni inductibili și, cum este de așteptat, fiecare operon nu poate fi indus în prezența glucozei. Acești operoni se numesc OPERONI SENSIBILI LA CATABOLIT.

Experimente genetice simple dovedesc că acești operoni sunt reglați de cAMP-CAP. Un mutant simplu în operonul zahărului (de exemplu **lac**$^-$ sau **mal**$^-$) apare spontan cu o frecvență de 10^{-6}. Un dublu-mutant va apare cu o frecvență de 10^{-12}. Dublu-mutanți care sunt fenotipic Lac$^-$Mal$^-$ sau Gal$^-$Ara$^-$ apar cu o frecvență măsurabilă, deci frecvența postulată de 10^{-12} este practic așa de mică că, teoretic, asemenea dublu-mutanți sunt nedetectabili. Acești aparent dublu-mutanți nu sunt consecința mutațiilor în operonii zaharurilor respective, ci, mai curând, se dovedesc a fi **crp**$^-$, cu alte cuvinte nu sunt capabili de a sintetiza adenilciclaza. Astfel, dacă se găsește un mutant Lac$^-$Mal$^-$, el este totdeauna, în același timp Gal$^-$Ara$^-$, Lac$^-$Ara$^-$ etc. Experiențele biochimice cu câțiva dintre acești operoni sensibili la catabolit arată că legarea cAMP-CAP are loc în regiunea promotoare, la fiecare din aceste sisteme.

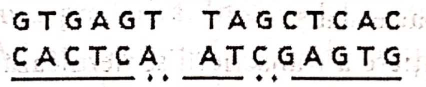
Segmentul de ADN care conține operatorul a fost izolat prin aplicarea procedeului de protecție la nuclează, constatându-se că represorul purificat a fost adsorbit la ADN izolat dintr-un fag transductant λ**lac**, reprezentând o variantă de fag lambda (λ) purtător al operonului **lac** de **E. coli**. Adăugarea DNazei a permis evidențierea unui segment de 24 perechi de baze lungime, care a rezistat atacului DNazei. Această secvență conține o repetiție inversată de baze de tipul ABCDEE'D'C'B'A' în care A și A' sunt baze complementare, capabile de a se împerechea. Asemenea secvență se numește PALINDROM și ea poate forma in vivo structuri *hairpin* sau structuri cu o tulpină (porțiune bicatenară) și o buclă (porțiune monocatenară), în urma împerecherilor complementare intracatenare.

Studiul mutațiilor-operator a demonstrat că această secvență palindromică reprezintă însuși operatorul. O singură modificare de baze, fie în secvența palindromică, fie în oricare alta dintre cele 24 de perechi de baze, conduce la pierderea capacității operatorului de a lega represorul.

Secvența de baze a operatorului **lac** este următoarea:

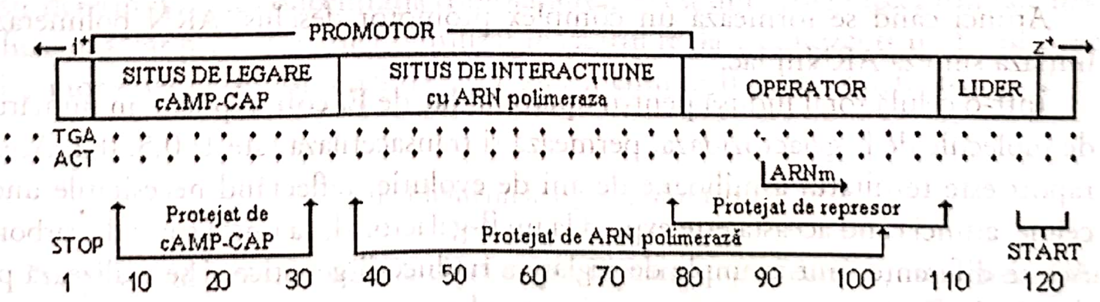

A TGTT C T
T ACAA G A
5' TGTGTG GAATTGT GAGCGGATAACAATTT CACACA 3'
3' ACACAC CTTAACA CTCGCCTATTGTTAAA GTGTGT 5'
sector protejat de represor față de atacul DN-azei

Situsul de legare a cAMP-CAP a fost, de asemenea, izolat prin tehnica protejării față de DN-ază și are următoarea secvență:


GTGAGT TAGCTCAC
CACTCA ATCGAGTG

Se remarcă faptul că și acest situs este un palindrom, cu excepția bazelor marcate cu puncte.

Regiunea reglatoarea a operonului lac de **E. coli** se prezintă astfel:


PROMOTOR
i⁺
z⁺
SITUS DE LEGARE cAMP-CAP
SITUS DE INTERACŢIUNE cu ARN polimeraza
OPERATOR
LIDER
TGA
ACT
ARNm
Protejat de cAMP-CAP
Protejat de represor
Protejat de ARN polimerază
STOP
START
1
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120

Se cunosc două mutații, evidențiate prin teste genetice și fiziologice și care au fost numite mutații promotor coborâtoare (“**down**“), deoarece au blocată sinteza ARNm. S-a dovedit că aceste mutații apar în urma schimbărilor de baze din regiunea reglatoare și la ele este blocată legarea cAMP-CAP. Aceasta este o dovadă a faptului că legarea cAMP-CAP este o precerință a transcripției, de la nivelul promotorului.

Situsul de inițiere a sintezei ARNm se află la nivelul operatorului. Represorul activ se leagă la acest situs, acoperindu-l. Promotorul este protejat față de digestia cu DNază, prin legarea la el a ARN polimerazei. Situsul de legare a cAMP-CAP este foarte aproape, de situsul de interacțiune cu ARN polimeraza, dar nu se suprapune acestuia.

Regiunea reglatoare a operonului lac are 115 perechi de baze, ceea ce corespunde la circa 12 tururi de dublu-helix ADN.

Ordinea locilor operonului **lac** este **ipoz**, ceea ce corespunde aceluia determinată prin analiză genetică.

Pentru a avea loc sinteza ARNm, complexul cAMP-CAP trebuie să se lege la promotor, iar operatorul nu trebuie să fie ocupat de un represor. Nu se cunoaște, în detaliu, mecanismul prin care cAMP-CAP stimulează, iar represorul inhibă transcripția. S-a stabilit însă care sunt bazele contactate la început de ARN polimerază și de represor.

Prezența cAMP-CAP stimulează legarea ARN polimerazei la ADN_{lac}, în experiențele efectuate in vitro, și adăugarea ulterioară a represorului nu mai determină îndepărtarea ARN polimerazei de pe ADN. Dacă represorul este el mai întâi legat la operator, ARN polimeraza nu poate forma un complex stabil, ci doar o legare tranzientă și foarte slabă.

Evenimentele de inițiere a transcrierii se derulează astfel:

ARN polimeraza formează un complex lax cu regiunea promotorului lac. Legarea cAMP-CAP slăbește probabil dublul helix pe o cale oarecare, facilitând formarea unui complex promotor deschis stabil. Represorul apare ca o proteină ce se opune „topirii“ (desfacerii — *melting*) dublului-helix ADN și, în consecință, blochează formarea unui complex deschis.

Atunci când se formează un complex promotor deschis, ARN polimeraza inițiază sinteza ARNm lac.

Într-o celulă total indusă pentru operonul **lac** de **E. coli**, raportul în numărul de molecule de β-galactozidază, permează și transacetilază este 1: 0,5: 0,2. Acest raport este rezultatul a milioane de ani de evoluție, reflectând necesitățile unei celule, atunci când aceasta este expusă la un β-galactozid, ca unică sursă de carbon. Aceste diferențe sunt exemple de reglare a traducerii genetice și se realizează pe două căi:

1. ARNm lac se detașează frecvent de pe ribozomul care îl traduce, după terminarea descifrării sale, adică a sintezei catenei polipeptidice. Frecvența cu care aceasta are loc este o funcție a probabilității de reinițiere la fiecare codon AUG subsecvent. Astfel, apare un gradient al sintezei de la terminalul 5' la terminalul 3' al ARNm, fapt evidențiat la majoritatea ARNm policistronice.

2. Degradarea ARNm lac este inițiată mai frecvent de sciziunile endonucleotidice la nivelul mesajului corespunzător genei **a**, decât la nivelul celui ce corespunde genei **z**, astfel, în orice moment, se întâlnesc mai multe copii complete ale mesajului genei **z**, decât ale genei **a**.

Rezultă deci că expresia generală a activității unui operator este reglată de controlul transcripției unui ARNm policistronic și concentrațiile relative ale proteinelor codificate în ARNm sunt determinate de controlul frecvenței translației fiecărui cistron.

3. OPERONUL TRIPTOFAN AL BACTERIEI ESCHERICHIA COLI

Operonul triptofanului (**trp**) este responsabil de sinteza triptofanului. Reglarea acestui operon se bazează pe principiul simplu că atunci când este prezent triptofanul în mediul de creștere al bacteriei nu este necesară activarea operonului **trp**. În acest caz, sistemul reglator blochează transcripția, atunci când triptofanul este prezent în cantitate adecvată și induce transcripția, atunci când triptofanul este absent. Cu alte cuvinte, triptofanul trebuie să fie activ, mai curând în represie, decât în inducție. Sistemul reglator al triptofanului este mai curând o cale metabolică biosintetică, nu degradativă. În consecință, nu apare o inhibiție prin glucoză. Astfel, cAMP-CAP nu joacă nici un rol în activitatea operonului **trp**.

În condiții de aprovizionare suboptimală cu triptofan, înfometarea cu triptofan este evitată prin evitarea represiei, până ce concentrația externă cu triptofan depășește nivelul critic, dar acest mecanism nu este prea eficient, deoarece mai multe decât cele necesare dintre enzimele biosintetice pot fi sintetizate. Dar, poate fi utilizat un sistem modulator în care proporția de transcripție în stare derepresată este determinată de concentrația triptofanului. Acest din urmă mecanism este mai eficient decât primul și este cel utilizat în cadrul reglării sintezei triptofanului, ca și a altor operoni biosintetici de aminoacizi, cum ar fi cel al izoleucinei.

3.1. Elementele operonului trp

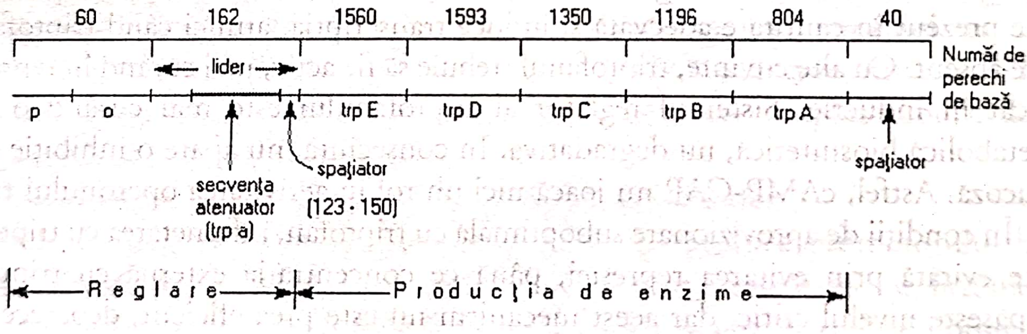
Triptofanul este sintetizat în cinci etape. Fiecare etapă necesită intervenția unei enzime specifice. Genele care codifică sinteza acestor enzime la **E. coli** sunt adiacente, în aceeași ordine în care ele intervin în calea biosintetică. Ele sunt traduse de pe un singur ARNm policistronic și sunt simbolizate **trp E**, **trp D**, **trpC**, **trp B** și **trp A**. Gena **trp** E este prima tradusă. Adiacent genei **trp** E se află promotorul, operatorul și două regiuni numite, una **lider** și alta **atenuator**, desemnate **trp l** și **trp a**. Gena reglatoare ce dirijează sintetiza represorului este desemnată **trp R** și este localizată foarte departe de clusterul genic susmenționat, ca și în cazul operonului **gal**. În reglarea operonului **trp** mai intervin și alte două elemente și anume ARN_t^{Trp} și triptofanil-ARN_t-sintetaza. Genele pentru aceste elemente sunt situate, de asemenea, departe de clusterul genic al operonului **trp**.

Mutațiile genei **trpR** ca și în operatorul operonului **trp** determină inițierea constitutivă a sintezei ARNm **trp**, așa cum se întâmplă și în cazul operonului **lac**.

Produsul proteinic al genei **trpR**, numit adesea **aporepresorul trp**, nu se leagă la operator, până ce triptofanul nu este prezent într-o anumită concentrație.

Aporepresorul trp și triptofanul se asociază spre a forma un represor activ care se poate lega la operator. Când rezerva externă de triptofan este redusă substanțial sau epuizată, aporepresorul **trp** rămâne singur și operatorul rămâne neocupat, astfel că transcripția poate avea loc nestingherit. Acesta este mecanismul de bază de tip +/—, „da sau nu“, „tot sau nimic“ sau „deschis-închis“.

Operatorul este o secvență palindromică cu 18-20 perechi de baze participante în simetrie.



Regiunile promotor și operator se suprapun semnificativ și legarea represorului activ și a ARN polimerazei este un proces de competiție, de vreme ce în experiențele in vitro, dacă se adaugă mai întâi represorul, ARN polimeraza nu se mai poate lega și vice versa. Nu se cunoaște dacă represorul acționează ca o proteină antidesfacere a dublului-helix, ca în cazul represorului **lac**.

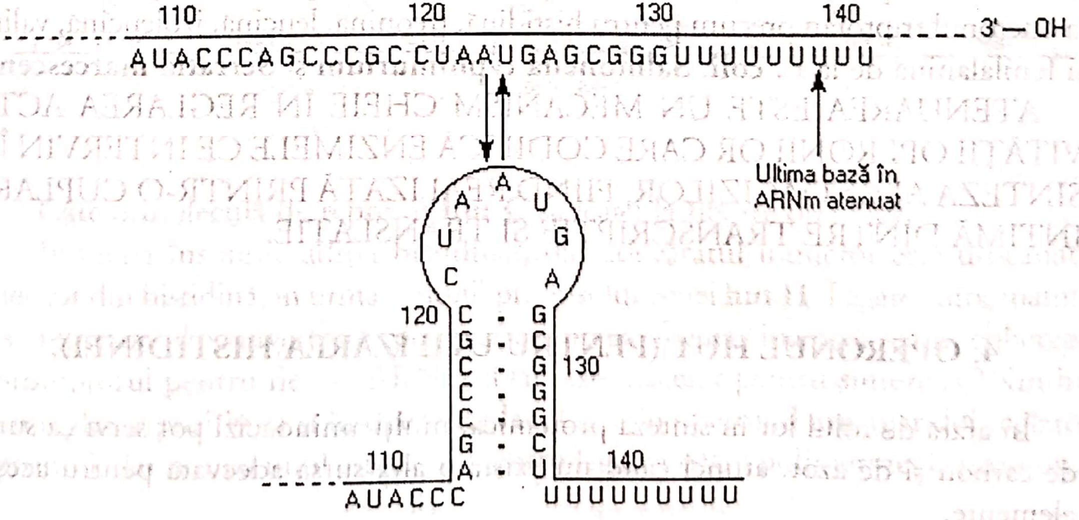
Mecanismul represor-operator este eficient pentru reglarea operonului **trp**. Cu toate acestea, în operonii responsabili pentru biosinteza aminoacizilor apare un mecanism reglator adițional care permite un control și mai fin, astfel încât concentrația enzimei să varieze în acord cu concentrația aminoacidului. Acest mecanism reglator este realizat pe două căi: printr-o terminare prematură a transcripției, înainte de a fi abordată prima genă structurală, și printr-o reglare a frecvenței acestei terminări, de către concentrația de aminoacid.

3.2. Atenuatorul și polipeptidul lider

Începând de la capătul 5' al moleculei de ARNm **trp** sunt 162 ribonucleotide înaintea codonului start al genei **trpE**. Această secvență a ARNm se numește **lider** (***leader***). În cadrul liderului se află o secvență de baze de la ribonucleotidul 123, până la ribonucleotidul 150 care, dacă este deletată, cauzează o creștere de 6 ori a sintezei enzimelor **trp**, fie într-o celulă derepresată, fie într-una constitutiv mutantă.

Astfel, perechile de baze 123-150 trebuie că au o activitate reglatoare. În plus, după inițierea sintezei ARNm, chiar dacă nu există deloc triptofan, majoritatea moleculelor de ARNm **trp** se termină în această regiune, generând o moleculă de ARNm cu doar 140 de nucleotide și blocarea genelor ce codifică enzimele **trp**. Aceasta explică de ce deleția acestei regiuni determină creșterea expresiei genice, adică a intensității transcrierii și, respectiv, a traducerii genelor **trp**. Această regiune, la nivelul căreia apare și este reglată terminarea transcripției, s-a numit **atenuator**. Ea prezintă trăsăturile obișnuite ale situsului de terminare — adică o posibilă configurație tulpină și buclă (hairpin) a ARNm.

Regiunea terminală a atenuatorului **trp** din ARNm se prezintă ca în schema de mai jos. Secvența de baze redată se extinde peste situsul de terminare, la poziția 140, spre a arăta lunga întindere cu resturi U. Configurația de tulpină + buclă este evidentă:



Experimental s-a dovedit că atenuarea reclamă prezența ARN_t^{Trp} încărcat, ceea ce sugerează că o anumită parte a liderului este tradusă.

Analiza secvenței lider evidențiază un codon AUG și codon stop UGA care vine ceva mai târziu. Dacă traducerea ar începe la codonul AUG, atunci s-ar sintetiza un polipeptid alcătuit din 14 aminoacizi. Acest ipotetic polipeptid, care nu a fost încă izolat, se numește **polipeptid lider**. Sunt unele date care atestă că polipeptidul acesta poate fi realmente sintetizat. De exemplu, există în ARNm un situs de legare la ribozom, exact de partea 5' a situsului AUG. în plus, fuziunea regiunii codificatoare a peptidului lider cu capătul genei **trpE** conduce la producerea unei proteine de fuziune ce are aceeași secvență NH_2 terminală pe care o are secvența peptidului lider.

Polipeptidul lider are o trăsătură interesantă și anume la pozițiile 10 și 11 se află două resturi triptofan adiacente, ceea ce înseamnă că în ARNm se află doi codoni adiacenți pentru triptofan. Acest lucru este semnificativ, deoarece în operonul histidinei, care are, de asemenea, un sistem atenuator (adică are ARNm prematur terminat), se întâlnește o secvență similară de baze, care poate codifica un polipeptid lider care are șapte resturi histidină adiacente.

Mecanismul de atenuare se pare că are la bază terminarea ARNm mediată prin traducerea „genei“ peptidului lider. Deoarece există doi codoni triptofan în această genă, abilitatea de a traduce secvența ar fi sensibilă la concentrația de ARN_t^{Trp} încărcat. Aceasta înseamnă că dacă cantitatea de triptofan este limitată, va fi insuficient ARN_t^{Trp} încărcat și de aici transcrierea de-a lungul codonilor triptofanului și traducerea sunt cuplate, așa cum se întâmplă de obicei la bacterii și că toate împerecherile de baze vor fi eliminate în segmentul ARNm care este în contact cu ribozomul.

Mulți operoni responsabili pentru biosinteza aminoacizilor sunt reglați prin atenuatori echipați cu mecanismul de împerechere de baze pentru competiția descrisă la operonul triptofan precum pentru histidină, treonină, leucină, izoleucină, valină și fenilalanină de la **E. coli, Salmonella typhimurium** și **Serratia marcescens**.

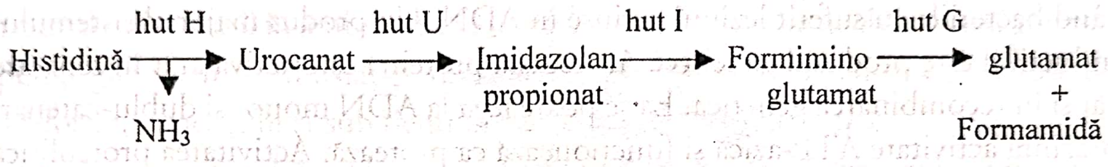
ATENUAREA ESTE UN MECANISM CHEIE ÎN REGLAREA ACTIVITĂȚII OPERONILOR CARE CODIFICĂ ENZIMELE CE INTERVIN ÎN SINTEZA AMINOACIZILOR, FIIND REALIZATĂ PRINTR-O CUPLARE INTIMĂ DINTRE TRANSCRIPȚIE ȘI TRANSLAȚIE.

4. OPERONUL HUT (PENTRU UTILIZAREA HISTIDINEI).

În afară de rolul lor în sinteza proteinică, mulți aminoacizi pot servi ca sursă de carbon și de azot, atunci când nu există o altă sursă adecvată pentru aceste elemente.

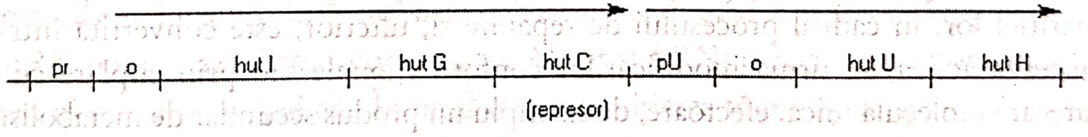
Datorită acestui rol dual, degradarea aminoacizilor trebuie reglată cu mare exactitate. Operonul **hut** este responsabil de degradarea histidinei. Recent, au fost clonate și izolate regiunile reglatoare ale acestui operon. El reprezintă un exemplu tipic de operon multiplu reglat, având doi promotori, doi operatori și doi reglatori pozitivi (pentru fiecare unitate promotor-operator) dintre care unul este numai o proteină reglatoare, dar, de asemenea, și o enzimă.

Calea utilizării (degradării) histidinei (operonul hut) cu desemnarea genelor care dirijează enzimele responsabile de realizarea fiecărei etape, la **Klebsiella aerogenes**, este redată în schema de mai jos.



Operonul **hut** codifică patru enzime specificate de genele **hut G, hut H, hut I** și **hut U** și un represor — produs al genei **hut C**. La **Klebsiella aerogenes** aceste gene sunt organizate în două unități de transcripție și anume **hut I hut G hut C** și **hut U hut H**. Operonul **hut** nu este întâlnit la **E. coli**. El a fost identificat și studiat la **Klebsiella aerogenes** și **Salmonella typhimurium**.

Harta genetică a operonului hut la **Klebsiella aerogenes** și **Salmonella typhimurium** (săgețile indică moleculele de ARNm) pr = promotor; o = operator.



Câte o moleculă de represor **hut C** se leagă la fiecare operator.

Inducția însoțește adiția histidinei, dar adevăratul inductor este urocanatul derivat din histidină, în urma acțiunii produsului genei **hut H**. Legarea urocanatului la represor îl convertește pe acesta într-o formă inactivă care eliberează promotorul pentru fiecare ARNm. Dar, este necesar pentru sinteza ARNm hut un reglator pozitiv ca și în operonul **lac**. Ca și în operonul **ara** apar doi reglatori pozitivi, dar numai unul este cerut pentru legarea ARN polimerazei la promotor.

Operonul **hut** este legat de aprovizionarea celulei cu carbon și azot, când aceste elemente sunt limitate.

Cantitatea de carbon disponibil este receptată de către sistemul cAMP.

Când lipsește carbonul, cAMP este sintetizat și atunci este prezent sistemul cAMP-CAP. Există un situs de legare a acestui complex în fiecare promotor al operonului **hut** și ocuparea acestui situs permite realizarea transcripției.

5. OPERONUL REC A

Sistemul de reparare SOS este un sistem inductibil care intră în funcțiune atunci când bacteriile au suferit leziuni extinse în ADN. Un produs major al sistemului inductibil este produsul genei **rec A**. Această proteină este activă atât în reparare cât și în recombinarea genetică. Ea se poate lega la ADN mono- și dublu-catenar, prezintă activitate ATP-azică și funcționează ca protează. Activitatea proteolitică este foarte slabă asupra unor proteine și foarte eficientă asupra unor represori din sistemul fagilor, tăind fiecare represor la un situs unic.

Lezarea ADN, prin iradiere UV, declanșează sinteza bogată de ARNm pentru proteina **rec A**. Proteina **rec A** este cerută pentru intrarea în funcție a operonului **rec A**. Proteina **rec A** este deci un reglator pozitiv. Există alternativa ca produsul **rec A** să aibe activitate inductoare.

O altă genă componentă a operonului **rec A** este **lex A** care codifică un represor simplu al operonului. În celulele neafectate, proteina **rec A** are proprietatea de a se lega la ADN, dar este lipsită de activitate proteolitică. Dimpotrivă, proteina **rec A** purificată are activitate proteolitică. Proteina **rec A**, în urma lezării ADN se leagă la regiunile monocatenare ale ADN lezat, produse în stadiul timpuriu al apariției lor, în cadrul procesului de reparare și, ulterior, este convertită într-o protează activă, în urma modificărilor conformaționale sau prin cuplare cu o oarecare moleculă mică, efectoare, de exemplu un produs secundar de metabolism ce se produce într-o etapă timpurie a activităților proteinei **rec A**.

Înfometarea celulei în aminoacizi antrenează luarea căii de modulare cantitativă, cunoscută sub numele de **răspuns stringent**. Aceasta reprezintă inhibiția sintezei ARNr, asociată cu sărăcirea în aminoacizi.

Dacă o cultură bacteriană este transferată de pe un mediu de creștere, în care creșterea este rapidă, pe unul, în care creșterea este înceată (aceasta se numește „trecere spre încetinire“ — **downshift**) conținutul de ribozomi al celulelor descrește, prin realizarea sintezei de ADN, fără a avea loc și sinteza de ARNr. În acest proces apar semnale recepționate de fiecare celulă care adoptă o creștere înceată și aceste semnale trebuie că inhibă transcripția genelor ARNr.

Aminoacizii nu sunt sintetizați, ca în cazul normal de creștere rapidă, datorită descreșterii rezervei de atomi de carbon. Descreșterea concentrației de aminoacizi reprezintă unul din semnalele recepționate de celulă. Se poate mima efectul „**downshift**", atunci când se transferă un mutant auxotrof pentru un aminoacid pe un mediu lipsit de acel aminoacid, de care are nevoie pentru a crește. Într-adevăr, în urma acestui transfer, sinteza de ARNr se oprește rapid. Această inhibiție a sintezei ARNr asociată cu sărăcirea în aminoacizi se numește **răspuns stringent**. Există mutanți la care sinteza ARNr continuă neabătut, în cursul înfometării în aminoacizi. Fenotipul acestor mutanți este descris ca fiind relaxat. Gena **rel A** este singura bine descifrată, dintre cele care condiționează un asemenea fenotip. În cursul înfometării în aminoacizi se produc două nucleotide neobișnuite și anume ppGpp-guanozin 5' difosfat-3'-difosfat și pppGpp adică guanozin 5'-trifosfat-3'-difosfat, cunoscute și sub denumirea de **petele magice 1 și 2**.

Produsul genei **rel A** este o proteină **-factor stringent**. Ea reprezintă o enzimă responsabilă de sinteza ppGpp. Factorul stringent este localizat exclusiv în subunitatea ribozomală 50S și este inactiv în cursul sintezei proteinice normale, când ppGpp nu se sintetizează.

Activarea factorului stringent are loc atunci când subunitatea 50S se află într-un ribozom intact 70S care este atașat la un ARNm angajat în translație, iar situsul A al ribozomului este ocupat de un ARNt neîncărcat cu aminoacid activat. În condiții de înfometare cu un aminoacid, ARNt care în mod normal căra acel aminoacid va rămâne neîncărcat. Sărăcirea în acel aminoacid conduce la producerea de ppGpp. Acest compus ppGpp semnalează că ceva a provocat stoparea sintezei proteinice și, în consecință, nu mai are loc sinteza de ARNr. Acest ppGpp se leagă la ARN polimerază. Promotorii pentru ARNr și ARNt diferă de promotorii altor operoni precum **lac**, **gal** etc. În mod specific, inițierea transcripției genelor ARNr are loc de patru ori mai eficient decât rata inducerii depline a operonului **lac**. Astfel, promotorul ARNr este cel mai eficient promotor cunoscut până acum. S-a sugerat că atunci când ARN polimeraza se leagă la ppGpp, ea pierde abilitatea de a se lega la promotorul ARNr.

Un proces complex de reglare a activității genelor este cel întâlnit în sinteza bazelor azotate purinice și pirimidinice, în care represorul din operonul purinelor este activ în operonul pirimidinelor și vice-versa, asigurându-se astfel sinteza în cantități echimolare a nucleotidelor purinice și primidinice — o cerință strictă impusă de complementaritatea bazelor azotate purinice și pirimidinice.

6. ROLUL PROTEINELOR RIBOZOMALE ÎN PROPRIA LOR TRANSLAȚIE

PROTEINELE RIBOZOMALE LIBERE REPRESEAZĂ TRANSLAȚIA ARNm CE POARTĂ MESAJUL GENETIC PENTRU SINTEZA LOR.

Genele pentru cele peste 50 de proteine ribozomale diferite ce intră în structura chimică a ribozomilor la bacteria *Escherichia coli* sunt localizate în peste 20 de operoni, dar sinteza acestor proteine este precis reglată și cantitatea unora comparativ cu a altora este precis echilibrată. ***Controlul sintezei proteinelor ribozomale este exercitat în primul rând la nivelul translației și apoi la nivelul transcripției***, ceea ce contrastează cu covârșitoarea majoritate a celorlalte proteine.

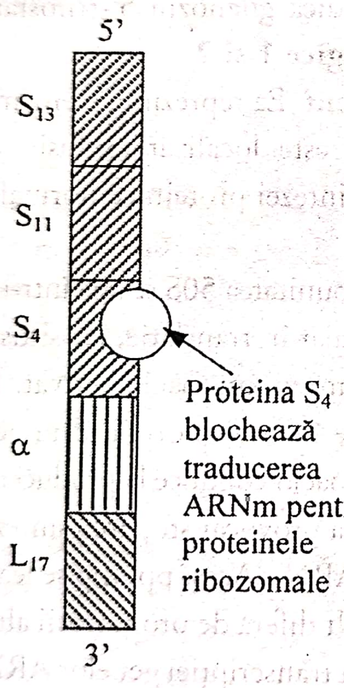

5'
S₁₃
S₁₁
S₄
α
L₁₇
3'
Proteina S₄ blochează traducerea ARNm pentru proteinele ribozomale

Fig. 3. — Controlul feedback prin represia translației. O proteină ribozomală (S_4) represează translația unui ARNm purtător al mesajului genetic pentru componentele proteinice ale subunității mici (S) și subunității mari (L) ale ribozomului, precum și pentru subunitatea α a ARN polimerazei (modificat din Stryer, 1995).

Cel puțin o proteină codificată de fiecare operon al proteinelor ribozomale servește ca un REPRESOR TRANSLAȚIONAL (fig. 3). El se leagă la ARNm în apropierea situsului de inițiere.

Acest represor translațional se leagă la ARNm în apropierea situsului de inițiere pentru propria sa sinteză și blochează sinteza tuturor celorlalte proteine al căror mesaj genetic este înscris în ARNm policistronic. Legarea la ARNm nu interferă cu asamblarea ribozomului, deoarece proteina ribozomală se leagă mai strâns la ARN ribozomal decât la ARNm. Represia translațională are loc numai atunci când producția de proteine ribozomale depășește pe aceea de ARN ribozomal sau atunci când proteinele ribozomale nu sunt sintetizate în cantități echimolare.

Și sinteza de ARNr și de ARNt este reglată coordonat cu sinteza de proteine neribozomale. Când în celulă se ivește o sărăcie de aminoacizi, sinteza acestor acizi ribonucleici încetează. Această adaptare la o situație adversă poartă denumirea de RĂSPUNS STRINGENT. Ea este mediată de un nucleotid neobișnuit numit inițial PATA MAGICĂ datorită apariției sale misterioase în cromatogramele unor extracte celulare. Noul compus ce se formează în cazul flămânzirii în aminoacizi este GUANOZIN 5'

— DIFOSFAT — 3' DIFOSFAT (ppGpp). El se formează prin transferul unui difosfat din ATP la 3'-OH unui GDP sau prin hidroliza pppGpp format din ATP și GTP. Formarea lui ppGpp sau pppGpp ce are loc în situsul A al ribozomului este catalizată de o sintetază numită FACTOR STRINGENT. Sinteza lui are loc numai atunci când un ARNt neacilat este prezent în situsul A. Așa se explică de ce pppGpp și ppGpp se formează numai în celulele flămânzite, deoarece în celulele aprovizionate cu aminoacizi, aproape totdeauna situsul A este ocupat de un ARNt încărcat cu un aminoacid activat. Odată format, ppGpp inhibă inițierea transcripției operonului ce codifică ARN ribozomal și încetinește alungirea multor alte transcripte.

CAPITOLUL XI

REGLAREA ACTIVITĂȚII GENICE LA EUCARIOTE

1. GENERALITĂȚI

Există diferențe semnificative în reglarea activității genice la procariote și eucariote.

Prin natura organizării celulei procariote, ADN-ul acesteia este oricând disponibil să primească semnale prezente în citoplasmă: controlul inițierii transcrierii genice stă la baza principiului „DA sau NU", din sinteza proteinelor.

Cu excepția formelor unicelulare precum drojdiile, algele monocelulare și protozoarele, eucariotele au alte cerințe în reglarea activității genice. Embrionul este un organism în curs de dezvoltare și diferențiere și în el o celulă trebuie nu numai să crească și să se dividă, spre a produce numeroase alte celule, dar acestea trebuie să sufere schimbări considerabile în morfologia și biochimia lor și **să fie capabile de a menține starea diferențiată,** altfel ia calea transformării maligne– a imortalizării. Aceasta este esența procesului de CITODIFERENȚIERE. Mai există și o altă diferență: o celulă bacteriană este nevoită să crească pe un mediu ale cărei proprietăți sunt schimbătoare, pe când celula eucariotă, aparținând unui țesut dintr-un organism pluricelular, își desfășoară activitatea într-un mediu relativ omogen, în ceea ce privește compoziția și concentrația componentelor sale — este vorba de sânge, limfă sau alte fluide ale corpului. O situație cvasiidentică se întâlnește în cazul organismelor marine al căror mediu de viață — apa mării — este oarecum omogen.

Iată caracteristicile generale ale reglării activității genice la eucariote (EK):

1. La EK genele nu sunt organizate în operoni, reglajul genetic realizându-se la nivelul genelor individuale. Ca urmare, fiecare moleculă de ARNm poartă mesajul genetic pentru o singură catenă polipeptidică, fiind deci un ARNm *monocistronic.*

2. ADN eucariotic este complexat cu histone și alte proteine nonhistonice, formând fibra de cromatină. Conformația spațială, tridimensională a nucleohistonelor joacă un rol important în funcționarea ADN ca matriță pentru sinteza ARN, superspiralizarea fibrei de cromatină împiedicând transcrierea genetică. Ca regulă, cromatina condensată nu poate fi transcrisă, pe când cromatina difuză permite funcționarea ADN ca matriță pentru sinteza ARN. Starea eucromatică și heterocromatică a cromatinei influențează rata transcrierii genice. Pufele cromozomilor politeni, respectiv inelele Balbiani, dintre care puful de la nivelul regiunii organizator nucleolare (NOR) este cel mai activ în sinteza ARNr, ca și buclele laterale ale cromozmilor lampbrush, sunt situsuri tipice de transcriere a diferitelor tipuri de ARN. Pufele cromozomilor politeni ca și buclele laterale ale cromozomilor lampbrush reprezintă treceri de la starea heterocromatică a cromomerelor, la starea eucromatică, propice transcrierii genice.

Folosindu-se ^{3}H-uridina, s-a evidențiat încorporarea acesteia la nivelul unor asemenea structuri eucromatice reprezentate de pufuri, respectiv inele Balbiani, la cromozomii politeni și buclele laterale la cromozomii lampbrush, vizualizându-se și electronomicroscopic transcrierea genelor ribozomale în axele de ADN ribozomal (ADNr) din interiorul nucleolilor extracromozomali, din ovocitele amfibienilor urodeli, de către Miller și colaboratorii săi (1969).

La eucariote, ADN este permanent complexat cu *histone* care joacă rol de represori nespecifici, adică represori ai tuturor genelor.

Ca urmare, la eucariote genele se află în mod obișnuit în stare represată, ele trebuind să fie induse să funcționeze, atunci când necesitățile celulei reclamă sinteza produșilor pe care genele îi specifică.

Activarea genelor eucariote este realizată prin activitatea specifică a proteinelor *nonhistonice*, numite încă *hertone*.

Dat fiind faptul că la eucariote, majoritatea genelor din genom sunt inactivate în orice moment, reglajul genetic se realizează nu prin blocarea activității lor (represie), ci prin activarea unor anumite gene (inducție), activarea și inactivarea genelor având caracter reversibil.

3. O caracteristică importantă a eucariotelor este că multe gene din genomul lor au un caracter redundant (se află în multiple copii), iar o proporție importantă dintre genele eucariote este implicată în reglarea activității altor gene.

4. La eucariote s-au diferențiat mecanisme de REARANJARE CONTROLATĂ A SEGMENTELOR de ADN, prin care sunt reconstituite gene funcționale sau este mărit numărul de gene.

5. La eucariote nu există o strictă colinearitate a secvenței de nucleotide din acizii nucleici cu secvențe de aminoacizi din catenele polipetidice, deoarece, cu foarte mici excepții (genele pentru histone, gena pentru interferon α),

covârșitoarea majoritate a genelor eucariote au o structură mozaicată, conținând exoni și introni, aceștia din urmă fiind transcriși dar netraduși în proteine.

6. Aspectele de reglaj genetic la eucariote sunt mai complexe, deoarece, în acest caz, și structura cromozomului eucariot este mai complexă, aceasta conținând 13-16% ADN, 12-13% ARN, 68-72% proteine cromozomale histonice și nonhistonice, mici cantități de lipide, ioni de Ca^+ și Mg^+.

Eucariotele conțin o mare cantitate de ADN. Dacă **E. coli** conține circa 1500 de gene și o cantitate de 8 x 10^6 perechi de baze, doar jumătate din acestea vor codifica proteinele, restul constituind lideri, spațiatori și regiuni reglatoare.

Drosophila melanogaster conține de două ori mai multe gene decât **E. coli** și de 20 de ori mai mult ADN decât această bacterie. Aceasta înseamnă că numai 5% din ADN drosofilei reprezintă secvențele codificatoare.

La mamifere, doar 2% din ADN reprezintă secvențe codificatoare. În concluzie, cantitatea totală de ADN este mult mai mare în celula eucariotă decât în celula procariotă, o enormă parte din ADN eucariotic fiind destinat reglajului genetic.

ADN bacterian izolat și fragmentat la întâmplare, în circa 50-100 piese și apoi centrifugat în gradient de densitate de clorură de cesiu (CsCl) formează o singură bandă îngustă, densitatea de plutire a ADN fiind proporțională cu conținutul în G + C al acestuia. Compoziția medie în baze a segmentelor de ADN care au câteva sute de perechi de baze nu variază foarte mult, de la un sector la altul al ADN.

Când se analizează ADN de crab (**Carcinus moenas**), pe o cale asemănătoare, se constată că apar două benzi:

– una principală, cu o compoziție de 50% A + T;

– una minoră, numită **ADN satelit**, cu o compoziție de 97% A + T.

Aceasta este cea mai neobișnuită compoziție în baze a unui ADN eucariot.

La diferitele specii eucariote, ADN satelit reprezintă între 1 și 30% din ADN total. ADN satelit conține secvențe repetate de baze, din care cauză se mai numește ADN repetitiv.

La **Bos taurus**, secvența repetată are 1400 perechi de nucleotide, pe când la unele specii de maimuțe aceasta are 172 p.n. ADN satelit de crab are repetată de milioane de ori secvența AT: — ATATATATATA… la **Drosophila virilis** se repetă de până la 107 ori secvențele: 5' — ACAATT- 3'; 5' — ACAAACT — 3'; 5' — ATAAACT — 3', ducând la apariția a trei benzi satelitice de ADN. Prin tehnica hibridizării moleculare in situ s-a permis localizarea ADN satelit în cromozomi. După denaturarea cu alcalii a ADN din cromozomii aflați pe lame microscopice, se utilizează ARN marcat cu ^{3}H-uridină și transcris anterior de pe ADN satelit. Se constată că materialul radioactiv se localizează la nivelul centromerului fiecărui cromozom. Rezultă că acest ADN satelit constituie

heterocromatina pericentromerică, cu rol important în defășurarea mitozei și meiozei, numită **heterocromatină constitutivă**.

Dacă la procariote (**E. coli**) ADN are secvențe unice, prezentând o curbă a renaturării cu o singură treaptă, la eucariote curba renaturării este mai complexă, procesul fiind multistadial. Aceasta deoarece, la eucariote, secvențele de nucleotide din ADN sunt de categorii diferite.

În general, ADN eucariot conține secvențe:

– unice, reprezentând gene structurale;

– ușor repetate (1 — 10 copii) precum sunt secvențele ce conțin genele pentru histone ARNr și ARNt;

– mijlociu repetate (de la 10, la câteva sute copii), reprezentând secvențele implicate în **reglarea activității genice**;

– înalt repetate (de la câteva sute la câteva milioane de copii), reprezentând secvențele scurte din ADN satelit sau secvențe de lungime normală pentru ARNr.

Au fost evidențiate două pattern-uri de interspersie de secvențe unice și secvențe repetate: 1) modelul **Drosophila**; 2) modelul **Xenopus**.

La eucariote este caracteristică organizarea genelor în **clusteri** genici. Genele repetate sunt localizate grupat pe același segment cromozomal.

Familiile genice reprezintă gene eucariote grupate funcțional, dar ele nu sunt organizate în operoni.

Genele pentru ARNr 5S de la **Xenopus** formează un șir gigantic, fiecare genă ARNr 5S fiind separată de o secvență genică adiacentă printr-un **spacer**. **Spacer**-ii conțin secvențe mijlociu repetate și sunt de 2-6 ori mai lungi decât secvența genică ARNr 5S. Clusterii genici ARNr 5S sunt prezenți în copii multiple, fiecare copie conținând sute până la mii de gene ARNr 5S.

O altă familie multigenică simplă în care o singură unitate de transcripție ce conține toate cele trei secvențe genice ribozomale este separată de spațiatori este reprezentată de genele pentru ARNr 5,8S, 18S și 28/25S.

Familii multigenice complexe sunt constituite dintr-un cluster de câteva gene înrudite, separate de spaceri și transcrise independent. De exemplu, familia genelor pentru histone cuprinde 5 gene ce codifică cinci fracții histonice. Genele pentru histone sunt conținute într-un segment mic de ADN de 7kDa, fiind separate de spaceri.

Această unitate de cinci gene este repetată în tandem de circa 1000 de ori. Transcrierea fiecărei gene este separată, dar coordonată cu a celorlalte, ARNm pentru fiecare fiind monocistronic și lipsit de introni. Transcrierea este astfel desfășurată cu o rată coordonată cu rata de translație, încât se asigură sinteza unor cantităţi echimolare ale fracţiilor histonice H_2A, H_2B, H_3, H_4 şi pe jumătate cantitatea de H_1, corespunzând proporţiei molare a acestora din cromatină.

La drojdia de bere, există doi clusteri genici diferiţi pentru histone, unul conţinând genele H_2A şi H_2B, celălalt conţinând celelalte fracţii histonice, diseminate în diferite situsuri ale genomului. Clusterii genici şi familii multigenice apar şi în cazul genelor pentru ARNt. Se cunosc 360 de gene pentru ARNt dintre care 175 au fost clonate în plasmide.

Familiile genice complexe sunt reprezentate de genele hemoglobinelor α, β, γ, σ. Genele pentru catenele α formează un cluster diferit de genele pentru catena β. De regulă, ordinea genelor în cluster este aceea în care aceste gene sunt exprimate în cursul dezvoltării.

Cele 7 niveluri de control ale expresiei genice la eucariote sunt:

1. replicarea diferenţiată;
2. controlul transcripţional (selecţia genică);
3. controlul procesării ARN;
4. controlul transportului ARN prin membrana nucleară;
5. controlul translaţional (selecţia moleculelor de ARNm pentru translaţie);
6. controlul degradării ARNm;
7. controlul activităţii proteinei.

Cel mai important este cel al reglării transcrierii, fiind singurul care nu implică sinteză inutilă (superfluă) de intermediari, asigurând aplicarea în sistemele biologice a principiilor economiei şi eficienţei.

La eucariote sunt două tipuri fundamentale de reglare a activităţii genice: reglare pe termen scurt şi reglare pe termen lung.

2. REGLARE PE TERMEN SCURT. ROLUL HORMONILOR, AL HISTONELOR ŞI AL NONHISTONELOR.

Reglarea pe termen scurt se realizează la nivelul transcrierii genetice. De exemplu, în cazul sintezei enzimei lactat-dehidrogenaza (LDH), la mamifere, are loc o transcriere diferenţiată în condiţii aerobe şi anaerobe. Enzima este formată din două catene polipeptidice A şi B, a căror sinteză este dirijată de două gene distincte A şi B. Ea este reprezentată de cinci isozime diferite — forme moleculare cu proprietăţi electroforetice distincte. Isozimele sunt tetrameri formaţi din 4 catene. Cele patru catene pot fi de acelaşi tip sau de tipuri diferite: 4A, 3A + 1B; 2A + 2B; 1A + 3B; 4B, rezultând isozimele desemnate LDH_5, LDH_4, LDH_3, LDH_2 şi LDH_1. Isozima LDH_5, de tip 4A, nu este funcţională în condiţii anaerobe, pe când cea de tip LDH$_1$ sau 4B este funcțională în asemenea condiții: celelalte isozime funcționează cu intensitate intermediară. Rezultă că, în funcție de natura mediului, anaerob sau aerob, sunt activate fie gena A, fie gena B. Celulele musculaturii scheletice conțin în cantitate mare LDH$_5$, pe când celulele inimii conțin în cantități mari LDH$_1$ și în mică cantitate LDH$_5$. Activarea –inactivarea celor două gene A și B s-a realizat în cursul citodiferențierii, într-o anumită ordine. Această transcriere diferențiată a fost evidențiată și la procariote. Astfel, la **Bacillus subtilis**, ARNm extras în diferite etape ale ciclului celular este diferit, în funcție de care gene sunt transcrise într-o etapă dată.

Un exemplu de reglare pe termen scurt este inducția enzimatică la ciupercile Ascomycetes precum **Neurospora**, **Saccharomyces** și **Aspergillus** ca și la algele eucariote precum **Chlamydomonas**, ca răspuns la prezența unui substrat nutritiv corespunzător și represia sintezei lor, ca urmare a absenței acelui substrat nutritiv.

Ciupercile se aseamănă astfel cu bacteriile în inducția și represia sintezei enzimelor care intervin în metabolizarea galactozei, în biosinteza leucinei, a purinelor și pirimidinelor etc.

Dar, între eucariotele inferioare (ciuperci, alge, protozoare) și cele superioare apar diferențe fundamentale privind reglarea activității genice. Eucariotele superioare se remarcă printr-o variată specializare celulară care determină îndeplinirea unor funcții specifice și imposibilitate îndeplinirii altor funcții. Mediul intern (sângele și hemolimfa), cu o compoziție cvasistabilă, *homeostazică* și *homeorapică*, previne marile fluctuații de mediu extern, fiecare celulă primind cantități relativ constante de ioni, zaharuri, aminoacizi și alte molecule esențiale. Astfel, eliberate de efortul de a contracara variațiile mari și bruște de mediu extern, celulele eucariote superioare pot să-și desfășoare complexele lor funcții pentru care s-au specializat.

Redundanța genelor eucariote poate fi implicată, printre altele, în reglarea transcrierii. Astfel, dacă o ARN-polimerază trebuie să treacă peste secvențele redundante, necodificatoare de proteine, asemenea secvențe pot funcționa ca programator în timp al transcrierii, cu cât secvența redundantă este mai lungă, cu atât transcrierea genei codificatoare de proteină este mai întârziată.

La eucariotele superioare, reglarea pe termen scurt este în cea mai mare parte mediată de hormoni. Un anumit hormon poate avea una sau mai multe tipuri de celulă țintă, fiecare tip de *celulă țintă* răspunzând diferit la același hormon. Unii hormoni reglează activitatea genelor afectând transcrierea, traducerea sau adenilat-ciclaza. Mulți hormoni exercită efectele lor inițiale pe celula țintă la periferia celulei, stimulând activitatea **adenilat-ciclazei** — enzimă localizată pe membrana celulară și care convertește ATP în ciclic-AMP, capabil de a stimula transcrierea genelor ca și la bacterii. AMP ciclic activează enzimele preexistente în celulă, cum ar fi de exemplu fosforilaza.

Unii hormoni afectează expresia genică la nivel cromozomal. Astfel, ecdizonul — un hormon steroid ce intervine în desfășurarea împupării — acționează ca moleculă reglatoare care interacționează cu anumite elemente de control din ADN sau servește ca moleculă efectoare care modifică activitatea unei anumite proteine reglatoare sau facilitează absorția de către celulă a anumitor ioni care stimulează transcrierea genelor implicate în împupare. La **Chironomus tentans** s-a stabilit existența unei ordini riguroase a pufării anumitor cromomere, în trecerea de la larvă de stadiu IV, la pupă. Aceeași eșalonare a pufării a fost remarcată la insecta dipteră **Rhynchosciara**, declanșarea împupării se realizează prin eliberarea spontană a ecdizonului în hemolimfă. Dacă larvele sunt injectate experimental cu ecdizon, înainte ca ele să înceapă împuparea, se constată că are loc pufarea cromomerelor cu aceeași succesiune care apare în mod normal la trecerea de la larvă la nimfă (pupă).

Faptul că hormonii steroizi acționează la nivelul transcrierii genice este dovedit de experiențele în care se folosește actinomicina D, inhibitor specific al transcrierii, și în care se dovedește că asemenea hormoni nu mai au nici un efect asupra celulelor țintă. Dimpotrivă, hormonii ce acționează pe calea cAMP sunt insensibili la actinomicina D.

Hormonii steroizi precum hormonii androgeni, estrogeni, aldosteronul, provoacă valuri de sinteză de ARN, în nucleii celulelor țintă, asemenea valuri de transcriere fiind comparabile cu fenomenul de pufare din sistemul politen al dipterelor. Marcarea radioactivă a hormonilor steroizi a demonstrat pătrunderea lor în citoplasma celulelor țintă, unde se pare că se combină cu o moleculă proteinică ce acționează ca un efector al transcrierii genetice. Din celulele uterului s-a putut izola o proteină receptoare a hormonului estradiol. Hormonul astfel recepționat poate fi transferat în nucleu, unde derepresează gene specifice, ce vor fi transcrise.

Unii hormoni pot stimula transcrierea prin afectarea histonelor. Hormonii de înflorire și estrogenii descresc conținutul de histonă al cromatinei.

Glucagonul și insulina cresc fosforilarea histonelor în ficatul de șobolan. Alți hormoni antagonici pot descrește rata sintezei ARN. Unii hormoni pot afecta traducerea, așa cum fac acidul abscisic, în germinarea timpurie la grâu. Alt hormon vegetal — citokinina — influențează încărcarea cu un aminoacid a unui ARNt specific.

În plante, hormonii precum auxinele, acționează, se pare, asupra unui ARNt specific, constituindu-se un complex ce condiționează inițierea transcrierii.

Au fost imaginate diferite mecanisme posibile pentru a explica reglarea activității genice la eucariote, în care rolul de molecule reglatoare este îndeplinit de diverse componente proteinice ale cromatinei. Histonele vechi sunt dobândite de către

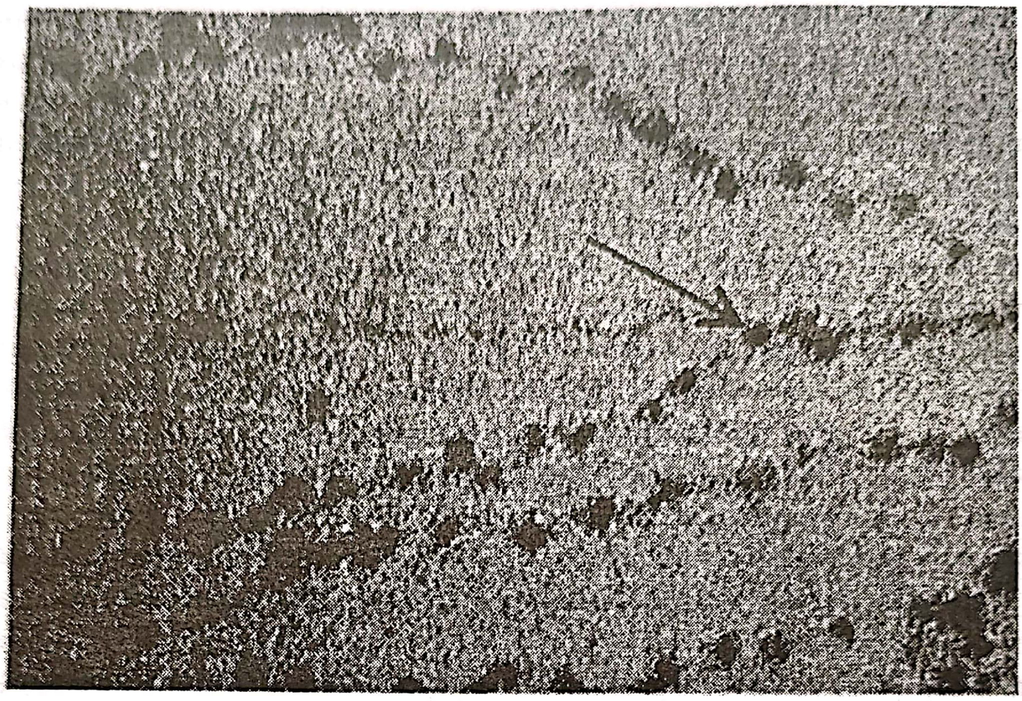


Fig. 1. — O bifurcație de replicare asimetrică (săgeata) generată de sinteza ARN în prezența cicloheximidei care blochează sinteza de noi histone. Unul dintre dublu-helixurile fiice ADN are aspect moniliform (șirag de mărgele) pe când celălalt este neted. Aceasta denotă că histonele parentale sunt legate doar la unul dintre dublu-helixurile fiice de ADN (după Riley și Weintraub, 1979).

molecula fiică de ADN formată pe catena conducătoare (fig. 1). Nucleosomii trebuie să fie îndepărtați la nivelul situsului start, spre a se permite începerea transcripției. ARN polimerazele eucariotelor, spre deosebire de cele procariote, nu pot transcrie pe cont propriu. Mai întâi la nivelul cutiei TATA trebuie să fie asamblat un aparat transcripțional alcătuit din numeroase componente. Activatorii și represorii expresiei genice la eucariote sunt reprezentați nu de una sau două proteine reglatoare, ca în cazul procariotelor, ci de multiple proteine. De exemplu, gena albuminei serice de șoarece conține șase situsuri de legare pentru proteinele de reglare, în vecinătatea cutiei TATA, și alte asemenea situsuri sunt situate la câteva baze mai departe. Activatorii transcripției conțin un ***domeniu de legare la ADN*** ce recunoaște o secvență specifică de nucleotide, și ***un domeniu de activare*** care ajută la asamblarea complexului de transcripție, la nivelul cutiei TATA. Domeniile de activare din genomul drojdiilor sunt active și în genomul uman.

Multe domenii de activare au încărcătură electrică negativă, ceea ce înseamnă că prezintă afinitate pentru regiuni încărcate pozitiv. Alte domenii de activare sunt bogate în glutamină și prolină. Domeniile de activare se pot lega la componentele complexelor de transcripție sau la proteine adaptoare care se leagă la acestea.

Regiunile activ transcrise din cromozmii eucariotici sunt submetilate și hipersensibile la DNaza I. Aceasta înseamnă că regiunile active transcripțional au puțini nucleosomi sau că structura acestora este modificată. Modificările covalente ale histonelor, precum fosforilarea și ubiquitinarea modifică afinitatea histonelor pentru ADN. Cele mai multe dintre situsurile hipersensibile la digestia cu DNază I sunt localizate la capetele 5' ale genelor transcrise. ADN nud nu este hipersensibil la digestia cu DNaza I. Hipersensibilitatea este conferită mai curând de legarea unor proteine reglatoare specifice la anumite situsuri țintă. Sensibilitatea crescută și hipersensibilitatea la digestia cu DNază I au specifitate tisulară și este reglată în cursul dezvoltării. Astfel, genele globinei în precursorii celulelor eritroide sunt sensibile la DNaza I la puii de găină de 20 de ore, pe când la cei de 35 ore la care începe sinteza hemoglobinei ele devin foarte susceptibile la digestie. Dimpotrivă, secvența genelor globinice din creier, care nu sunt transcrise este rezistentă la DNaza I, în tot cursul dezvoltării, inclusiv în perioada adultă. Hipersensibilitatea se corelează și cu expresia activă a genelor specifice dintr-un șir de gene. Capetele 5' ale genelor g, d și b din celulele eritroide fetale sunt sensibile la DNaza I, pe când în celulele măduvei oaselor, la adult, doar genele d și b rămân hipersensibile la digestia enzimatică. S-a constat că ***genele globinelor sunt hipermetilate în celulele neeritroide și hipometilate în celulele eritroide***. Genele g, de exemplu, conțin o secvență CCGG în poziția –54, între cutia TATA și un situs promotor din amonte. Metilarea unei citozine din această secvență plasează un grup metil ce pătrunde în adâncitura majoră a ADN care poate interfera cu un factor de legare ce stimulează transcripția.

În general, genele active ale mamiferelor sunt mai puțin metilate decât cele inactive. Dar, metilarea ADN nu este un mecanism reglator universal la eucariotele superioare. La ADN de la *Drosophila* nu este cunoscută metilarea, ca mecanism de reglare a activității transcripționale.

Histonele pot determina proprietățile transcripționale ale ADN. Prin modificări chimice precum fosforilarea, acetilarea, metilarea resturilor aminoacilice ale histonelor se modifică interacțiunea ADN-histonă, ceea ce are ca efect modificarea proprietăților transcripționale ale cromatinei. Histonele joacă rol de represori generali, nespecifici, ai genelor eucariote, din care cauză complexul ADN-histonă este inert transcripțional. Eliminarea histonelor din cromatina izolată din embrionii de mazăre determină o creștere a ratei de sinteză a ARN din sistemele „in vitro", de circa 500%.

Proteinele nehistonice îndeplinesc rolul unor activatori specifici ai genelor eucariote, asigurând transcrierea diferențiată a genelor prin interacțiune cu histonele pe care le îndepărtează de pe ADN, la nivelul genelor care urmează să funcționeze, asociindu-se cu segmentul respectiv din ADN. Prin fosforilare, proteinele nonhistonice se încarcă cu grupări fosfat negative, astfel că ele capătă afinitate pentru încărcătura pozitivă a histonelor.

Atracția nonhistonelor pentru încărcătura pozitivă a histonelor este mult mai mare decât aceea dintre încărcătura negativă a ADN și încărcătura pozitivă a histonelor. Se formează astfel un complex de neutralizare nonhistonă-histonă care scoate histonele de pe ADN, pe porțiunea corespunzătoare genei ce urmează să funcționeze, astfel că ADN-ul devine „nud“, nemaifiind complexat cu histone. În această stare, ADN poate să funcționeze ca matriță pentru sinteza ARN. După ce are loc transcrierea genică, ADN se reasociază cu histonele, trecând din nou în stare represată. Asocierea ADN cu histonele este posibilă, deoarece prin defosforilare, nonhistonele pierd afinitatea lor pentru histone. Histonele eliberate din complexul histonă-nonhistonă, prezentând încărcătura pozitivă, se vor complexa din nou cu ADN, care are încărcătura negativă datorită prezenței în structura sa a grupelor fosfat. Se reconstituie astfel complexul nucleo-histonic care este inert transcripțional. Este posibil ca îndepărtarea histonelor de pe ADN să se realizeze prin acțiunea enzimatică a histon-proteazei.

ADN din spermatozoizi este inactiv transcripțional, datorită complexării locale cu protaminele (salmina la somon, clupeina la heringi etc.).

La eucariote, în reglarea activității genice a fost implicat și ARN cromozomal. Această fracție de ARN cromozomal se cuplează cu anumite regiuni ale ADN, reprezentând gene diferite, condiționând activarea sau represarea acestora.

3. REGLAREA GENETICĂ PE TERMEN LUNG. HETEROCROMATINIZAREA ȘI EFECTUL DE POZIȚIE.

Organismele eucariote prezintă și alte mecanisme de reglare a transcrierii legate de organizarea cromatinei.

Heterocromatinizarea, caracterizată printr-o condensare pronunțată a cromatinei, este însoțită de o funcționare redusă sau chiar de imposibilitatea funcționării ADN ca matriță pentru sinteza ARN. Ca urmare, prin heterocromatinizare este blocată transcrierea genică.

Heterocromatina puternic condensată este prezentă în celulele înalt diferențiate care sintetizează foarte puține proteine, comparativ cu celulele nediferențiate. În leucocitele normale apar mase mari de heterocromatină, sub forma unor blocuri puternic condensate, dispuse spre periferia nucleului, pe când în leucocitele transformate malign, care suferă o revenire la starea nediferențiată, tipică leucemiei, heterocromatina este aproape complet absentă, în celula leucemică având loc o foarte bogată sinteză proteinică, necontrolată și haotică și ca urmare, ADN-ul, poate funcționa ca matriță pentru sinteza ARN.

Există două categorii de *heterocromatină*: *constitutivă* și *facultativă*.

Heterocromatina constitutivă este localizată de regulă în regiunea pericentromerică sau la capetele cromozomului (la telomere), iar uneori poate fi distribuită la nivelul unor mici regiuni dispersate de-a lungul cromozomului. Dacă heterocromatina — cromatina condensată — este de regulă inactivă transcripțional, eucromatina — cromatina difuză sau necondensată — este activă transcripțional. O ruptură cromozomală la nivelul heterocromatinei, care pare a fi mai sensibilă la iradiere, poate fi urmată de translocarea unui segment heterocromatic într-o regiune eucromatică a cromozomului. Contactul regiunii heterocromatice cu o regiune eucromatică se poate realiza și prin inversie. În ambele situații, heterocromatina exercită un efect de represare a genelor din eucromatină, regiunea eucromatică suferind heterocromatinizare, demonstrându-se astfel reversibilitatea celor două stări fizice de condensare ale cromatinei eucariote. Este posibil ca și genele represate ale heterocromatinei, la contactul acesteia cu o regiune eucromatică a cromozomului, să fie activate. De exemplu, dacă regiunea $3C_2$ a cromozomului X, la nivelul căreia se află gena w^+ ce determină culoarea roșie a ochilor la **D. melanogaster**, este translocată printr-o inversie paracentrică, astfel încât ea vine în apropierea heterocromatinei constitutive de la nivelul centromerului, această regiune suferă heterocromatinizarea, rezultând o *heterocromatină facultativă*.

Dacă heterocromatina constitutivă este identică cantitativ și din punct de vedere al distribuției sale pentru cei doi cromozomi omologi ai unei perechi considerate, heterocromatina facultativă nu este identică cantitativ și distribuțional, pentru cei doi cromozomi omologi, unul posedând asemenea heterocromatină, celălalt neposedând-o. Heterocromatina facultativă a regiunii $3C_2$ face ca gena w^+ să fie parțial inactivată, astfel că la asemenea musculițe vor apare ochi mozaicați: porțiuni care vor avea culoarea roșie-cărămizie, caracteristică tipului normal (sălbatic), vor fi intercalate cu porțiuni de culoare albă — caracteristică mutantei „white“ (ochi albi).

Un segment heterocromatic intrat prin translocație într-o regiune eucromatică, deci într-un alt mediu genetic, va fi eucromatinizat, genele sale devenind astfel funcționale, alterând totodată expresia genelor din regiunea eucromatică în care a pătruns. Și la șoarece a fost remarcat faptul că, atât heterocromatina constitutivă cât și aceea facultativă prezintă aceleași proprietăți reglatoare.

4. INACTIVAREA PRIN HETEROCROMATINIZARE SPECIFICĂ A UNOR ANUMIȚI CROMOZOMI — *LIONIZAREA*

Interesante mecanisme de heterocromatinizare, prin care se diferențiază așa-numita *heterocromatină facultativă*, s-au evidențiat la insectele coccide.

Astfel, la **Planococcus citri**, care are 2n=10 (un set de 5 cromozomi de origine maternă, celălalt de origine paternă), ambele seturi de cromozomi sunt active transcripțional, în toate stadiile de dezvoltare la femelă dar, în dezvoltarea timpurie a embrionului mascul (stadiul de blastulă), setul de cromozomi de origine paternă este selectiv inactivat, prin heterocromatinizare, astfel că în celulele adulte rămâne activ transcripțional doar setul de cromozomi de origine maternă. În meioză, la mascul, nu are loc împerecherea cromozomilor de origine maternă și paternă, în Anafaza 1 cromozomii clivând după modelul mitotic. A doua diviziune meiotică (în fond tot o mitoză) duce la separarea cromozomilor eucromatici la un pol și a celor heterocromatici la alt pol. Astfel, numai 50% dintre spermatozoizi și anume cei care primesc setul de cromozomi de origine maternă (cromozomi eucromatici), vor fi funcționali. Aici este vorba de un *reglaj genetic la nivelul genomului*. Există însă și un *reglaj genetic la nivel cromozomal*.

La cangur și la alte marsupiale, cromozomul X derivat de la mascul este selectiv inactivat în celulele femelei.

La mamiferele placentare, cercetătoarea Mary Lyon a descris mecanismul de reglaj genetic prin care are loc heterocromatinizarea unuia dintre cei doi cromozomi X de la femelă, prin care apare o heterocromatină facultativă care se prezintă sub forma unui corpuscul ovoid, lipit de membrana internă a nucleului interfazic, și care s-a numit *corpuscul Barr* sau *cromatină sexuală*. Prin tehnica autoradiografiei s-a dovedit că acest corpuscul Barr este inactiv în transcriere.

Acest mecanism de reglare genetică prin care unul din cei doi cromozomi X ai femelei mamiferelor este inactivat genetic prin heterocromatinizare, asigurându-se astfel *compensația de doză* a genelor X-lincate, adică egalitatea între numărul genelor X-lincate la sexul femel și la cel mascul, s-a numit, în cinstea autoarei, care a studiat intens acest mecanism, Mary Lyon, LIONIZARE.

Cromozomii X care prezintă deleții, sunt preferențial heterocromatinizați dar, în condiții normale, inactivarea unuia dintre cromozomii X este randomizată, în unele celule fiind inactivat cromozomul X de origine maternă, în altele, cromozomul X de origine paternă. Însă, odată luată decizia de inactivare într-o anumită celulă, aceasta va fi moștenită de toți descendenții acelei celule. Chiar și genele care sunt permanent blocate trebuie să fie replicate în fiecare ciclu mitotic. Cromozomii care dau corpusculul Barr au replicare tardivă, condiția condensată interfazică interferând atât cu replicarea cât și cu transcrierea ADN.

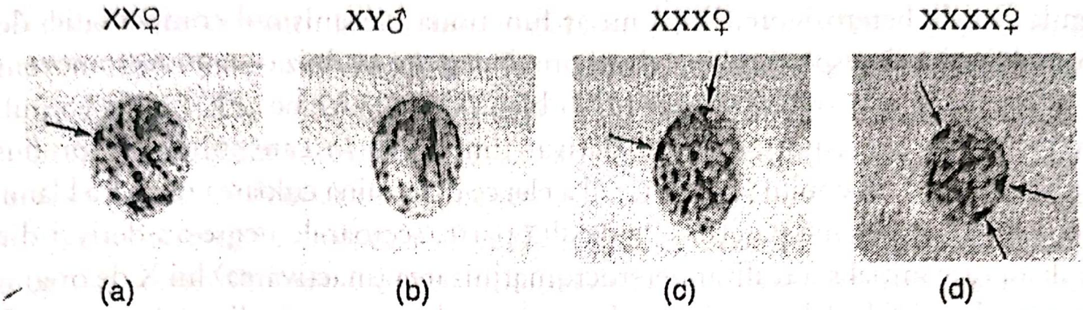


Fig. 5. — Nucleii interfazici din mucoasa bucală de femeie (XX) și bărbat (XY).
(a) Nucleu de la o femeie normală, cu un corpuscul Barr (săgeata);
(b) Nucleu de bărbat lipsit de corpuscul Barr;
(c) Nucleu de la o femeie cu sindrom triplo-X care prezintă doi corpusculi Barr (săgețile);
(d) Nucleu de la o femeie cu patru cromozomi X, care prezintă trei corpusculi Barr (după Suzuki și colab., 1988).

La începutul dezvoltării embrionului femel, ambii cromozomi sunt eucromatici și deci activi în sinteza ARN. La om ca și la alte mamifere, inactivarea unuia sau a unei părți a cromozomului X apare în celule somatice, la puțin timp după fecundare.

În stadiul de blastulă, aproximativ în a 16-a zi de viață intrauterină, unul dintre cei doi cromozomi X ai unui embrion XX se heterocromatinizează și devine nefuncțional (fig. 5). Ambii cromozomi X sunt însă funcționali în linia germinală femelă, când ei se asociază în meioză, spre a forma bivalentul sexului și realizează schimb reciproc de gene. Aceasta este o dovadă a faptului că heterocromatinizarea este facultativă și poate fi reversibilă.

În urma unei translocații reciproce X-autozom, heterocromatinizarea se extinde parțial și asupra genelor autozomale translocate, adiacente regiunii de sudură, o genă autozomală comportându-se în acest caz ca o genă X-lincată. Indivizii la care a avut loc o asemenea translocație prezintă fenomenul de VARIEGARE.

Fenomenul lionizării este cel mai bine evidențiat la pisicile *calico* (rezultate din încrucișarea motanilor negri cu pisicile portocalii) care au blana neagră cu pete portocalii. Aceste pisici sunt heterozigote pentru alelele X-lincate ce determină culoarea neagră și portocalie a blănii. Pisicile calico au blană cu sectoare neregulate de culoare neagră care alternează cu sectoare de culoare portocalie, pe tot corpul. Fiecare asemenea sector corespunde unei clone de celule derivate dintr-o celulă în care s-a produs heterocromatinizarea inițială, fie a cromozomului X, purtător al alelei dominante ce determină culoarea neagră, fie a cromozomului X omolog, purtător al alelei recesive ce determină culoarea portocalie. Pisicile calico sunt de regulă femele heterozigote. Dacă nu ar funcționa mecanismul compensației de doză, al lionizării, respectiv al inactivări prin heterocromatinizare a unui cromozom X, aceste femele ar trebui să prezinte o blană de culoare neagră, pe tot corpul. Sectoarele cu blană portocalie au derivat din celula în care inițial s-a produs inactivarea cromozomului X purtător al alelei ce determină culoarea neagră a blănii, deci a lui X de origine paternă. Pe de altă parte, sectoarele negre au derivat din celula în care inițial s-a realizat heterocromatinizarea (inactivarea) lui X de origine maternă. De altfel, alela recesivă ce determină culoarea portocalie nici nu se poate exprima în prezența alelei dominante, ce determină culoarea neagră a blănii.

Există și motani calico care sunt sterili, deoarece ei prezintă sindromul Klinefelter, având un cromozom X suplimentar, fiind deci XXY. Motanii normali nu pot fi decât, fie cu blană neagră, fie cu balnă portocalie (alela recesivă pentru culoarea portocalie se exprimă, în acest caz, în stare hemizigotă). La motanii calico, având sindromul Klinfelter și prezentând deci un cromozom X suplimentar, intervine mecanismul compensației de doză de gene X-lincate, având loc inactivarea randomizată prin heterocromatinizare a cromozomului X purtător al alelei dominante ce determină culoarea neagră a blănii și, în consecință, se poate exprima alela recesivă ce determină culoarea portocalie, sau a cromozmului X purtător al alelei recesive ce determină culoarea portocalie și atunci apare, pe porțiunea respectivă, culoarea neagră a blănii.

Inactivarea prin heterocromatinizare a fost dovedită și în culturi de fibroblaste umane, prelevate de la femei heterozigote pentru gena X-lincată a *glucozo-6-fosfat-dehidrogenazei* (G-6-PD). Există o alelă mutantă recesivă a acestei gene, care determină o enzimă modificată. De la o femeie heterozigotă se pot preleva fibroblaste, producându-se clone fie cu gena normală, fie cu gena mutantă, în consecință unele clone celulare produc fie enzima normală, fie enzima modificată, mutantă, dar niciodată nu apare în aceeași clonă celulară un amestec al acestor două enzime, normală și mutantă. Aceasta se poate explica prin heterocromatinizarea (inactivare) randomizată a cromozomului X matern, în unele clone, și a celui patern, în altele.

Ca urmare a lionizării, femeile heterozigote pentru gena G-6-PD prezintă un fenotip mozaicat.

Lionizarea este un mecanism de reglaj genetic elaborat în cursul evoluției mamiferelor, în cadrul căruia, paralel cu inactivarea cromozomlui Y, de la sexul mascul, a avut loc inactivarea și a unuia dintre cei doi cromozomi X, de la femelă. Celulele mamiferelor au fost programate astfel ca numai un singur cromozom X să rămână eucromatic și deci funcțional, în fiecare celulă. Când apar cromozomi X suplimentari (triplo X- în cazul sindromului de superfemelă — XXX, sau în sindromul Klinefelter — XXY, la bărbat) — doar unul singur rămâne funcțional, ceilalți se heterocromatinizează, fiind astfel inactivi și devenind cromatine sexuale. Aceasta este o ipoteză teleologică, legată de fenomenul lionizării, dar nu se știe nimic despre mecanismul real al inițierii, efectuării și menținerii sale.

Și la **Drosophila melanogaster**, la care apare aceeași formulă cromozomală a sexelor, a fost evidențiat un asemenea mecanism de heterocromatinizare facultativă, care face ca în cromozomii X de la ambele sexe să apară regiuni heterocromatice și eucromatice. Contrar situației de la mamifere însă, alelele din ambii cromozomi X de la femelă sunt aparent în egală măsură funcționale, ceea ce înseamnă că la drosofilă, mecanismul compensației de doză apare mai curând la nivelul transcrierii, neimplicând heterocromatinizarea, putând avea loc fie represia unuia dintre cromozomii X de la femelă, fie stimularea funcției (amplificarea transcrierii) unicului cromozom X, de la mascul.

Condensarea interfazică a unuia dintre cei doi cromozomi X de la femela mamiferelor, care face ca aceasta să apară sub forma corpuscului Barr (cromatina sexuală, descoperită de Barr și Bertram, în neuronii de pisică) determină blocarea transcrierii alelelor purtate de acest cromozom X. Prin autoradiografie, s-a constatat că la nivelul corpuscului Barr numai 18% din capacitatea de încorporare a uridinei tritiate de la nivelul cromozomului X activ are loc în cazul fibroblastelor de la femelă. De aici, s-a dedus că mecanismul compensației de doză de gene X-lincate afectează o mare parte a cromozomului X, dar nu întregul cromozom, acesta fiind un exemplu tipic de reglare a acțiunii genice la nivel multigenic, în cadrul genomului eucariot.

Rezultă că celulele mamiferelor sunt astfel programate ca numai un singur cromozom X să rămână eucromatic și să fie funcțional, în fiecare celulă, pe când celălalt sau ceilalți (când apar cromozomi X suplimentari) să fie inactivați prin heterocromatinizare devenind cromatine sexuale (corpusculi Barr) vizibile în nucleul interfazic.

5. EFECTUL DE POZIȚIE

La eucariote s-a mai dovedit că localizarea relativă a genelor în cromozom este un factor important în reglarea activității genice.

La **D. melanogaster**, în regiunea 16A, de pe brațul 1 al cromozomului uriaș, ce corespunde cromozomului X, se află gena care condiționează forma normală, rotund ovală, a ochilor, la această musculiță.

Când segmentul corespunzător regiunii 16A este prezent o singură dată, apare tipul normal de formă a ochiului. Dacă are loc duplicația acestui segment, fiind prezent, în două copii, apare un fenotip mutant denumit *Barr*, în cadrul căruia ochiul se îngustează, căpătând formă de bară. Femelele heterozigote (B/+) pentru

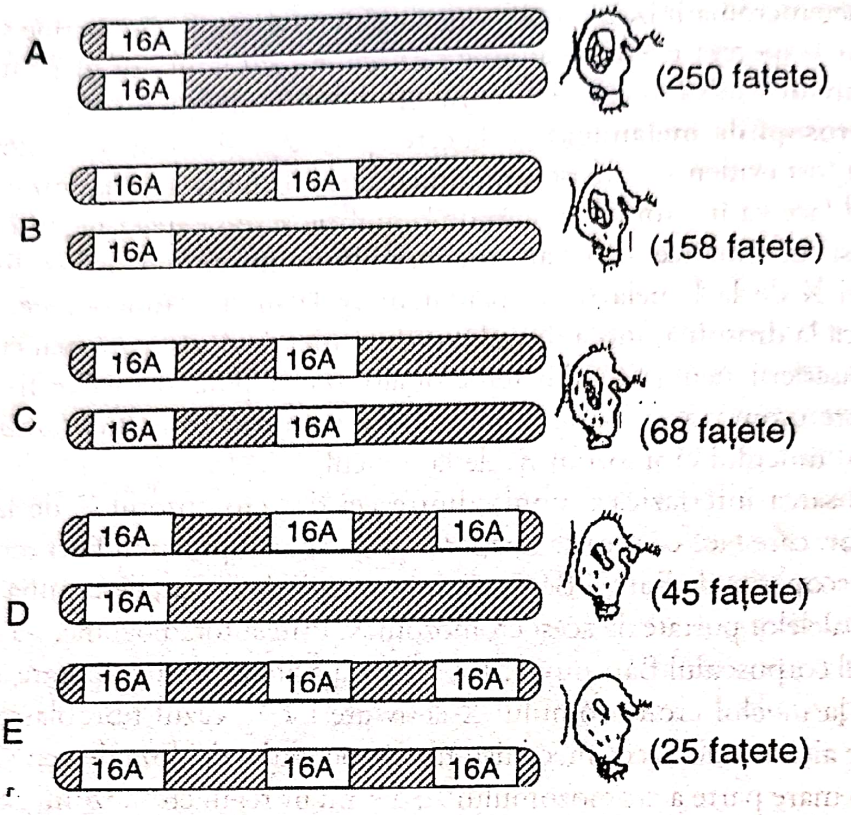


Fig. 6. — Efectul dozei de gene și al poziției cis-trans a copiilor duplicate ale genei Bar, asupra morfologiei și a numărului omatidiilor ochilor la *D. melanogaster* și fenotipurile rezultate din aceste aranjamente. A. normal; B. Bar heterozigot; C. Bar homozigot; D. ultra-Bar heterozigot; E. ultra-Bar homozigot (după Levine, 1973).

Barr (adică cu 2 segmente 16A, pe un cromozom X, și cu unul singur pe celălalt cromozom X) prezintă ochi de dimensiune mai redusă, față de tipul sălbatic. Masculii hemizigoți (cu două segmente 16A pe unicul lor cromozom X, Y nepurtând segmentul respectiv, deoarece nu este omolog cu X) ca și femelele homozigote de tip B/B, au ochi de dimensiune extrem de redusă. Prin crossing-over inegal, la femelele B/B, rezultă în unele cazuri indivizi (BB/+) ce poartă trei copii ale segmentului 16A, pe cromozomul lor X (fig. 6). Dacă indivizii B/B au în medie 68 omatidii per ochi, cei (BB/+) au numai 45, deși cele două tipuri B/B și BB/+ poartă același număr de segmente 16A, numai că, în primul caz, câte o copie suplimentară 16A se află pe fiecare din cei doi cromozomi omologi X, deci în poziția TRANS, pe când în cel de-al doilea caz, cele două copii suplimentare se află pe un singur cromozom X, pe când celălalt cromozom X poartă doar copia originală, copiile suplimentare ale regiunii 16A fiind, în acest caz, în poziție CIS (de aceeași parte, adică în același cromozom). Exprimarea fenotipului este așadar nu atât o funcție a numărului de copii genice, cât a poziției acestora în cromozom.

Există și mutanta Ultra-Barr care, în condiție heterozigotă are trei copii ale regiunii 16A pe un cromozom X și numai una pe cromozomului X omolog, iar în condiție homozigotă are câte trei copii ale regiunii 16A pe fiecare dintre cei doi cromozomi omologi X. În primul caz ochii musculiței sunt foarte reduși, având circa 45 omatidii, pe când genotipul Ultra-Bar homozigot determină un fenotip extrem — ochii au doar 25 de fațete, fiind abia vizibili. Fenotipul Bar este deci consecința unei *mutații realizată prin duplicație* și se manifestă diferit în funcție de poziția genelor în cromozom.

Efecte de poziție au fost remarcate și la bacteria **E. coli**. Cu ajutorul fagilor transductanți s-au „construit“ tulpini bacteriene în care genele structurale *lac* au fost aduse în vecinătatea *operonului trp*, al triptofansintetazei, sau în vecinătatea regiunilor operatoare *pur E* (din operonul purinelor). Această transpoziționare a făcut ca sinteza de β-galactozidază să fie sensibilă la concentrațiile intracelulare de triptofan și purine, indiferent de concentrația de lactoză. Deci, elemente de control specifice pentru un set de gene pot să-și exercite controlul și asupra unui set de gene venite în vecinătatea lor prin transducție sau prin transpoziție.

6. POZIȚIA GENELOR ÎN CROMOZOMI ȘI REGLAREA ACTIVITĂȚII GENICE

Funcționarea genelor eucariote poate fi condiționată de poziția lor în cromozomi: *cis*, când alelele considerate sunt plasate într-un același cromozom, *trans*, când alelele considerate sunt plasate una într-un cromozom, celalaltă în cromozomul omolog. Astfel, la **D. melanogaster** există indivizi care prezintă ochi de culoarea caisei (**apr**, de la engl. *apricot* = caisă). Analiza genetică a evidențiat că la asemenea indivizi gena **apr** se află în poziția trans față de gena w, cele două gene aparținând de fapt unei aceleiași regiuni cromozomale care, transcrisă într-o moleculă unică de ARNm, condiționează sinteza pigmentului ochilor, această regiune fiind deci o unitate funcțională, dar având două subregiuni de mutație și de recombinare (apr și w). Dacă în regiunea respectivă, într-un anumit situs, apare numai mutația *apr*, restul regiunii prezentând o secvență normală de nucleotide, culoarea ochilor musculiței este asemănătoare caisei. Dacă la nivelul regiunii respective, într-un alt situs, diferit de cel în care a apărut mutația **apr**, apare mutația **white**, restul regiunii prezentând secvența normală de nucleotide, apare fenotipul *white* (ochi albi). Dacă în regiunea respectivă apare pe lângă mutația **apr** și mutația **white**, cele două gene mutante se vor găsi într-un același cromozom, adică în poziția CIS; înseamnă că la nivelul regiunii cromozomale ce deține informația genetică pentru sinteza pigmentului, ambele subregiuni au suferit mutația și, ca urmare, nu se mai sintetizează nici un fel de pigment, apărând, de asemenea, fenotipul „ochi albi". Când se întâmplă ca, porțiunile ce poartă informația genetică normală pentru sinteza pigmentului ochilor să ajungă pe într-un același cromozom, adică în poziția CIS, regiunea respectivă va deține informația intactă pentru sinteza pigmentului, ceea ce va face ca ARNm unic, transcris la nivelul întregii regiuni pentru pigmentația ochilor, să poarte un mesaj genetic complet care va condiționa sinteza pigmentului roșu-cărămiziu. Astfel, va reapare tipul normal, sălbatic, din încrucișarea a două mutante „apricot" și „white". Aceste mutante sunt determinate de alterarea secvenței de nucleotide ce aparține unei aceleiași regiuni, numai că aceasta este o regiune complexă, care însă funcționează ca unitate în dirijarea sintezei pigmenților ochilor. Trecerea din poziția trans în poziția cis și viceversa, a celor două mutante, nu se poate face decât printr-un mecanism de recombinare de tip crossing-over intragenic. Frecvența unui asemenea eveniment este însă foarte mică.

Apariția recombinanților în cazul **„apricot"** și **„white"**, considerate inițial a aparține aceleiași serii polialelice, a culorii ochilor la drosofilă (w^+ — w), a făcut ca gena **apr** să fie considerată a nu aparține acestei serii polialelice, ci ca reprezentând o genă distinctă. Genele **w** și **apr** sunt transcrise însă într-un același ARNm în poziție cis, dar la heterozigoți, în poziție TRANS, ele nu se află pe un același cromozom și, ca urmare, sunt transcrise în molecule diferite de ARNm, apărând un fenotip modificat. Aceasta a fost ***numit efectul de poziție CIS-TRANS***.

Aplicarea testului CIS-TRANS în experiențe de COMPLEMENTAȚIE GENICĂ (două gene cu mutație în situsuri diferite concură la sinteza unui produs genic normal, dacă ajung să fie într-o aceiași celulă, pe când, aflate în celule diferite, dirijeajă sinteza de produși genici alterați) la fagul T4 a permis lui S. Benzer (1957) să definescă gena drept unitate de funcție care dirijează sinteza unei catene polipeptidice și care s-a numit CISTRON denumire derivată tocmai de la acest test CIS-TRANS. El a dovedit că CISTRONUL, funcționând ca unitate în dirijarea sintezei unui produs genic dat, poate prezenta nenumărate subunități de mutație (MUTONI) sau de recombinare (RECONI), cea mai mică subunitate de mutație și de recombinare fiind perechea de nucleotide.

Efectul de poziție ne arată că funcționarea genelor depinde nu numai de existența lor ca atare, ci și de poziția lor în cromozom, ca și de vecinătatea lor cu alte gene. Funcția unei gene se poate modifica nu numai prin modificarea structurii sale, prin mutație, ci și prin schimbarea vecinătății cu alte gene, adică prin plasarea sa într-un alt mediu genic.

7. HORMONII SEXUALI ȘI REGLAREA ACTIVITĂȚII GENICE

În diferențierea sexelor, heterozomii joacă un rol primordial, ei condiționând realizarea sex-ratio-ului.

La om, în primele 30-35 de zile de după fecundarea ovulului și formarea zigotului, pe mezonefros începe diferențierea gonadelor, în regiunea de organizare a acestora migrând și fixându-se și celulele germinale primordiale, diferențiate la nivelul *plasmei germinative* a ovulului fecundat. În stadiul inițial de organogeneză, gonada primordială sau progonada este identică la cele două sexe, având două zone — una internă = medula, alta externă = cortexul. Celulele germinale primordiale ajung în cortex. La embrionul determinat cromozomal XX, celulele germinale primordiale rămân la nivelul cortexului care se dezvoltă, proliferează, dând astfel naștere ovarului, pe când medula regresează.

La embrionul determinat cromozomal XY, în a 40-a zi de viață intrauterină, celulele germinale primordiale, în urma acțiunii produsului genei masculinizării, migrează în medulă. Gena masculinizării se află într-o regiune adiacentă centromerului, din cromozomul Y. În acest caz, cortexul regresează, iar medula progonadei proliferează, devenind testicul.

În a 47-a zi de la concepție, diferențierea gonadelor este desăvârșită. Gonadele diferențiate încep producerea de hormoni sexuali. Mutația genei pentru masculinizare face ca un individ determinat cromozomal XY să devină femelă, dacă mutația respectivă duce la blocarea sintezei produsului acestei gene. Dacă are loc translocarea acestei gene de pe Y pe un autozom, unde ea funcționează normal, așa cum s-a descris la șoarece și la om, indivizii determinați cromozomal XX devin funcțional masculi. Există după unii autori o anumită TENDINȚĂ ÎNĂSCUTĂ CA EMBRIONII MAMIFERELOR SĂ SE DEZVOLTE CA FEMELE, indiferent de determismul lor cromozomal XX sau XY. Astfel, eliminarea de foarte timpuriu a testiculelor unui embrion mascul (XY) face ca acesta să devină funcțional femelă. Pe de altă parte, acționând cu TESTOSTERON — hormon steroid mascul, produs de testicule — asupra unui embrion femel (XX), acesta se va transforma într-un mascul funcțional. Testosteronul apare deci ca un inductor în cadrul sistemului complex de reglaj genetic, reprezentat de MASCULINITATE și FEMINITATE. Testosteronul devine activ numai dacă se cuplează cu o proteină reglatoare receptoare ce posedă două situsuri de recunoaștere, unul pentru testosteron, altul pentru cuplarea cu circa 250 de loci din genomul nuclear al unor CELULE ȚINTĂ asupra cărora acționează testosteronul. În interiorul celulei țintă testosteronul este convertit în 5-dehidrotestosteron. Prin acțiunea complexului hormon-receptor asupra celor 250 de loci, are loc derepresia unor gene structurale. Aceasta funcționând, dirijează sinteza a circa 30 de proteine care au, de regulă, o acțiune enzimatică în desăvâr;irea diferențierii pe linia masculinizării. Pe cromozomul X se află gena Tfm — genă reglatoare de care depinde evoluția embrionului pe linia masculinizării sau feminizării. Această genă s-a numit gena feminizării testiculare, Tfm provenind de la „**testicular feminization**". Aceasta, deoarece, mutația genei Tfm face ca ea să devină inactivă, în care caz, indivizii purtători ai mutației la om, bovine, câine și șoarece, devin femele, deși posedă testicule care însă sunt localizate intrabdominal.

CAPITOLUL XII

CITODIFRENȚIEREA SAU DIFERENȚIEREA STRUCTURAL-FUNCȚIONALĂ A CELULELOR

1. GENERALITĂȚI

Cuvântul ***diferențiere*** derivă de la verbul latin ***diferre*** care înseamnă a se răspândi, a se divide (formă tranzitivă) sau a fi diferit de… (formă intranzitivă) ori a se distinge de… sau a diferi de…, ceea ce implică divergență, deviere, diferență, diversitate. Existența, funcționarea eficientă și propagarea organismelor multicelulare depind de interacțiunea coordonată a celulelor specializate pentru îndeplinirea diferitelor funcții. Particularitățile biochimice și morfologice ce caracterizează diferitele tipuri de celule ale unui organism multicelular sunt rezultatul diferențierii celulare, al realizării selective, din punct de vedere cantitativ și calitativ, a unor părți distincte ale unui material genetic dat, adică al expresiei genice diferențiate. Diferențierea celulară în cele din urmă se desfășoară ca răspuns la semnalele venite din mediul extracelular care sunt recunoscute și transformate dacă celulele sunt competente, adică dacă conțin receptorul corespunzător și sistemele de transformare a semnalelor. Dar, în multe cazuri, răspunsul include multe programe complexe de expresie genică ale căror desfășurare și desăvârșire sunt relativ autonome și a căror geneză este determinată de factori reglatori inerenți ai celulei afectate.

Citodiferențierea nu este restrictă la organismele multicelulare. Eucariotele unicelulare și procariotele răspund tot atât de bine la semnalele din mediul înconjurător, cu schimbări de scurtă durată în modelele lor de expresie genică, dar cu schimbări profunde în stările lor de dezvoltare. Mai mult, există numeroase exemple de organisme unicelulare, atât eucariotice cât și procariote care formează, în timpul unor faze distincte din ciclul lor de viață, agregate multicelulare foarte complexe, cu specializări morfologice și de funcții celulare.

Termenul de „citodiferențiere“ se referă și la cazuri de specializare ireversibilă a celulelor care, în unele situații extreme, pot implica pierderea de material genetic (ca la eritrocitele mature de mamifere) sau chiar moarte celulară (celulele xilemului, la plante vasculare).

Programele de expresie genică determinată și coordonarea lor intercelulară în rețeaua de interacțiuni fizice și chimice celulă — celulă, în cadrul unui organism multicelular, implică mecanisme reglatoare complexe, cuprinse în două procese indisolubil legate: determinarea șI diferențierea. Determinarea apare a fi un aspect special al citodiferențierii, așa-numita diferențiere criptică, care poate implica translocări de gene sau formarea de proteine reglatoare sau de ARN și care este de fapt „uvertura diferențierii“, conducând la expresia tuturor caracteristicilor determinate pentru tipul particular celular.

Există cinci aspecte principale ale citodiferențierii:

- recepția de semnale și transformarea acestora;
- alterări selective în materialul genetic;
- expresia genică diferențiată;
- organizarea programelor de expresie genică;
- coordonarea intercelulară a diferențierii celulare, cu programe de dezvoltare a țesuturilor, organelor și organismelor.

Caracteristica esențială a citodiferențierii este că toate schimbările modelelor de expresie genică se desfășoară în mediul metabolic și reglator oferit de citoplasmă care reflectă „istoria generală a diferențierii acelei celule“ și a predecesorilor săi. Alături de componentele structurale și catalitice ale expresiei genice, factorii citoplasmatici joacă un rol decisiv pentru blocarea expresiei genice diferențiate și pentru controlul aspectelor sale cantitative și calitative. Există un flux constant de informație din mediul extracelular filtrat prin sistemele de transformare de semnale ale membranei celulare și citoplasmei la locurile unde are loc expresia genică. La rândul său, produsul expresiei genice influențează sau constituie acest mediu citoplasmatic sau poate conduce la schimbări cantitative sau calitative în modelul de semnale transmise de o anumită celulă, la celulele înconjurătoare. Acest fel de informare reciprocă constituie baza programelor de expresie genică și a coordonărilor intercelulare.

Citodiferențierea este un proces tipic de reglare genică pe termen lung.

În dezvoltarea eucariotelor cu reproducere sexuală se pornește de la o celulă inițială — oul sau zigotul —, rezultat al unirii gameților de sex opus în procesul de fecundație. Zigotul este el însuși o celulă foarte specializată, îndeplinind funcții specifice pe care nu le mai poate îndeplini celula matură.

Produșii meiozei, gameții, sunt celule a căror existență este de scurtă durată. În mod normal, ei nu se divid și mor, dacă nu se unesc în procesul de fecundație, spre a da oul sau zigotul. Ovulul și spermatozoidul sunt celule haploide — extrem de specializate. Dintre toate celulele unui organism pluricelular, doar ovulul și spermatozoidul își transmit ADN-ul la generația următoare. Ovulul nu poate supraviețui singur, datorită echipamentului enzimatic excesiv, inclusiv hidrolitic, localizat în citoplasma sa. Pe de altă parte, spermatozoidul nu poate trăi, datorită sărăciei sale în citoplasmă și, deci, în echipamentul enzimatic. Când se unesc, în procesul de fecundație, ovulul și spermatozoidul se potențează reciproc, formând zigotul, punct de plecare în dezvoltarea unui nou organism.

Prin diviziuni sucesive ale zigotului (*diviziuni de clivaj*) rezultă numeroase celule care suferă determinare exactă din primele faze ale dezvoltării embrionare, astfel că din fiecare rezultă câte o clonă celulară care se va diferenția fie ca celule hepatice, fie ca celule renale, fie ca celule neuronale etc, deoarece determinarea este urmată de complicate procese de diferențiere care presupun diviziune celulară, fuziune celulară, migrație celulară, precum și alte procese și interacțiuni celulare, toate desfășurate după un program bine conturat, în care are loc o succesiune exactă de evenimente care se presupun unele pe altele, realizându-se în fapt PROGRAMUL GENETIC al individului, parte integrantă a programului genetic al speciei. Diferențierea celulelor, țesuturilor și organelor este un proces complex de EPIGENEZĂ, diferențierea celulară realizându-se după un orologiu biologic specific fiecărei specii și individ, care funcționează cu mare exactitate. Organismul uman adult este alcătuit din circa 10^{13} celule, de peste 100 de tipuri diferite, diferențiate și specializate structural și funcțional, în celulele specializate fiind activă doar o mică parte din cantitatea totală de informație genetică.

În condiții normale, citodiferențierea determină apariția unor DIFERENȚE STABILE, ireversibile, între celulele corpului, fără posibilitatea revenirii la forma inițială, din stadiul embrionar. Aceasta este diferența de principiu între citodiferențierea întâlnită la celulele eucariote, a căror durată de viață este lungă, și inducția și represia enzimatică — fenomene reversibile — întâlnite la celulele procariote a căror durată de viață este mai scurtă, dar care au viteză de multiplicare foarte rapidă.

În condiții anormale — cum sunt cele care caracterizează transformarea malignă — celulele diferențiate se reîntorc la o stare dediferențiată, cvasiembrionară, cu ritmuri rapide de diviziune, dar aceste diviziuni sunt anarhice, necontrolate.

De îndată ce a avut loc **determinarea** celulelor maduvei sau epidermei spre a deveni *eritrocite*, în care are loc sinteza de hemoglobină, respectiv, în primul caz, spre a deveni *celule ale pielii*, producătoare de keratină, în cel de al doilea caz, aceste celule inițial determinate spre a deveni asemenea celule specializate, ca și toate ce vor deriva din ele prin mitoză, vor fi ireversibil determinate în direcția aleasă inițial.

Se admite că asemenea procese de determinare primară se realizează prin acționarea unor mecanisme complexe de reglaj genetic, la nivelul întregului genom, prin interacțiuni multiple și complexe între gene, cromozomi și citoplasmă celulară, care fac, ca deși toate celulele corpului prezintă aceleași gene, în unele să funcționeze doar o parte dintre ele și, astfel, aceste celule să se diferențieze într-o anumită direcție, pe când, în alte celule, să funcționeze alte gene, și asemenea celule să se diferențieze în altă direcție.

Unul dintre cele mai importante aspecte ale citodiferențierii este controlul expresiei genice, care poate fi exercitat la nivelul sintezei **ADN**, prin *replicare diferențiată*, la nivelul sintezei **ARN**, prin *transcriere diferențiată*, în diferite tipuri de celulele, primar diferențiate, și la nivel **citoplasmatic**, prin *traducere diferențiată* (ARNm purtător al mesajului genetic pentru hemoglobina de iepure a fost injectat în ovule nefecundate de broască, dar ovulul traduce cu mai mare eficiență mesajele genetice proprii).

Moleculele de ARNm cu durată variabilă de viață au rol în controlul traducerii în dezvoltare și diferențiere. Diferite tipuri de ARNm cu durată scurtă de viață apar în celule, în toate stadiile de diferențiere. Cu cât mai scurtă este durata de viață a unui ARNm, cu atât mai repede celula poate să represeze mai ușor transcrierea acelui ARNm. ARNm cu durată mijlocie de viață apare în celulele mitotice active și inactive. În unele celule el este temporal depozitat în poliribozomi inactivi, așa cum este cazul ARNm ce poartă mesajul genetic pentru keratina penei. În această categorie intră și ARNm pentru hemoglobina embrionară și ARNm pentru fibroina firului de mătase, la **Bombyx mori**. ARNm cu durată medie de viață este deci folosit pentru a susține sinteza unor produși speciali care caracterizează celulele înalt specializate.

ARNm cu durată lungă de viață se află în sporii procariotelor și eucariotelor care germinează după mulți ani, de la formarea lor. La eucariotele superioare, acest tip de ARNm depozitat în semințe poate fi responsabil pentru sinteza proteinică din perioada postgerminativă timpurie, în timpul germinării neavând loc sinteza ARN. ARNm în unele semințe poate persista timp de secole, unele semințe găsite în vase antice, germinând după 1700 de ani! ARNm și tipuri de ARN cu durată lungă de viață apar și în ovogeneza amfibienilor. ARNm cu durată lungă de viață funcționează ca depozitar de mesaj genetic, necesar spre a susține o rapidă și intensă creștere a cantității totale de protoplasmă (cazul semințelor) sau o desfășurare a proceselor din dezvoltarea timpurie (cazul sporilor și ovocitelor) după inițierea metabolismului activ, care urmează unei perioade de repaus.

Din cele relatate mai sus se desprinde o concluzie generală: SINTEZA DIFERITELOR TIPURI DE PROTEINE ÎN CELULELE AFLATE PE CALE DE DIFERENȚIERE ESTE REGLATĂ ÎN PRINCIPAL LA NIVELUL TRANSCRIERII și mai puțin la nivelul replicării sau al traducerii genetice. Prin transcriere diferențiată se asigură sinteza diferitelor tipuri de proteine, în diferite celule aflate pe cale de diferențiere. Interesante sunt ultimele descoperiri în domeniul

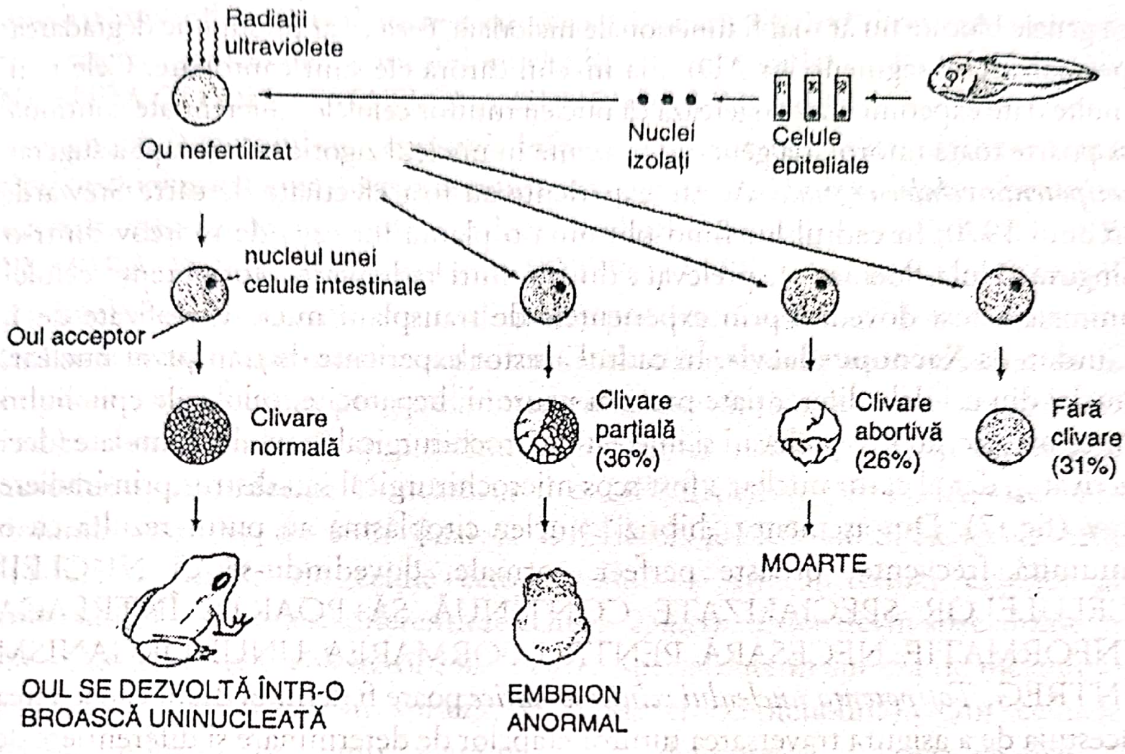

Radiații ultraviolete
Ou nefertilizat
Nuclei izolați
Celule epiteliale
nucleul unei celule intestinale
Oul acceptor
Clivare normală
Clivare parțială (36%)
Clivare abortivă (26%)
Fără clivare (31%)
MOARTE
OUL SE DEZVOLTĂ ÎNTR-O BROASCĂ UNINUCLEATĂ
EMBRION ANORMAL

Fig. 7. — Nucleul unui ovul nefertilizat de broască a fost îndepărtat prin iradiere cu ultraviolete. Nucleul îndepărtat poate fi înlocuit cu un nucleu izolat dintr-o celulă epitelială intestinală, aparținând unui mormoloc. Un mic procent de ovule nefertilizate cu nuclei transplantați s-au dezvoltat în broaște mature. (Alter J. Gurdon, 1968).

transcrierii, legate de reglarea acestui proces. Aceste descoperiri sunt reprezentate de evidențierea existenței *genelor antisens* și a ARN antimesanger.

R. Britten și E. Davidson (1969) au elaborat un model de reglaj genetic pentru a explica interacțiunea nucleu-citoplasmă în cadrul căreia există patru tipuri de gene. Genele **structurale** dețin informația genetică pentru sinteza diferitelor catene polipetidice. Activitatea lor este controlată de genele **receptoare**, adiacente genelor structurale. Există, de asemenea, gene **integratoare**, prin a căror transcriere rezultă un *ARN activator* cu specificitate pentru genele receptoare. Genele **sensor** activează gena integratoare, în urma cuplării sale cu un semnal chimic, reprezentat de exemplu de un hormon. Acesta este un model ipotetic care încearcă să redea ierarhia funcțională a genelor eucariote.

Cum toate celulele au aceeași cantitate de ADN și deci o aceeași informație genetică, înseamnă că o celulă înalt specializată pentru îndeplinirea unei funcții particulare trebuie să-și blocheze toate genele cu excepția acelora care controlează funcția considerată și activitățile generale de întreținere (*housekeeping*), acestea din urmă fiind îndeplinite în egală măsură, de orice tip de celulă. Așadar, nu înseamnă că genele blocate nu ar mai fi funcționale niciodată, ceea ce ar presupune degradarea permanentă a segmentelor ADN, la nivelul cărora ele sunt cantonate. Cele mai multe date experimentale sugerează că nucleii tuturor celulelor diferențiate continuă să poarte toată informația genetică prezentă în nucleul zigotic. Acest fapt a sugerat *totipotența celulei vegetale*. Aceste experiențe au fost efectuate de către Steward, în anul 1970, în cadrul lor fiind obținută o plantă întreagă de morcov dintr-o singură celulă floematică, prelevată din țesuturi radiculare. Totipotența celulei animale a fost dovedită prin experiențele de transplant nuclear, realizate de J. Gurdon, la **Xaenopus laevis**. În cadrul acestor experiențe de transplant nuclear, nuclei din celulele diferențiate precum neuroni, hepatocite, celule ale epiteliului intestinal etc, au fost prelevați și injectați microchirurgical în ovule fecundate (deci activate), dar al căror nucleu a fost scos microchirurgical sau distrus prin iradiere UV (fig. 7). Din asemenea „hibrizi" nucleu-citoplasmă au putut rezulta cu o anumită frecvență, broaște perfect normale, dovedindu-se că NUCLEII CELULELOR SPECIALIZATE CONTINUĂ SĂ POARTE ÎNTREAGA INFORMAȚIE NECESARĂ PENTRU FORMAREA UNUI ORGANISM ÎNTREG. *Totipotența nucleului celulei somatice* poate fi definită drept capacitatea acestuia de a asigura traversarea tuturor etapelor de determinare și diferențiere de către un ovul activat dar enucleat, cu diferențierea unui organism normal, identic genetic cu acela de la care a fost prelevat nucleul transplantat, dar mai tânăr de cât acesta cu timpul ce corespunde vârstei sale. Aceste este, în esență, procesul CLONĂRII REPRODUCTIVE.

2. ROLUL CITOPLASMEI ÎN CITODIFERENȚIERE

Experiențele de transplant nuclear inițiate de către R. Briggs și T.J. King, în anul 1955, și perfecționate, ulterior, de către J.B. Gurdon (1968), au dovedit implicarea citoplasmei în diferențierea celulară. Gurdon a constatat că, atunci când un nucleu interfazic al unui eritrocit sau al unui neuron (care nu se divide, având un volum mic, datorită stării condensate a cromatinei sale) este injectat microchirurgical, cu o pipetă microscopică de sticlă, într-un ovul fecundant, dar enucleat, nucleul neuronului recapătă dimensiunea nucleului unui ovul fecundat. Mai mult, într-un asemenea nucleu neuronal, transplantat în ovulul enucleat, începe sinteza de ADN, evidențiată autoradiografic cu ajutorul marcajului cu ^{3}H-timidină, având loc și reglarea corespunzătoare a intensității sintezei ARN. Prin aceasta, s-a dovedit că CITOPLASMA ARE IMPORTANȚĂ DECISIVĂ ÎN MENȚINEREA STĂRII DE DIFRENȚIERE, în ea acumulându-se molecule reglatoare a căror interacțiune întărește și stabilizează starea de diferențiere. Un nucleu străin, introdus în citoplasma celulei diferențiate, prin transplantare sau fuziune celulară, intră imediat sub influența reglatoare a citoplasmei gazdă, reglând direct sau indirect transcrierea genică de la nivelul nucleului. Există așadar o REGLARE DE NATURĂ CITOPLASMATICĂ A GENELOR NUCLEARE.

Genomul zigotului care cuprinde informația ereditară atât de origine paternă cât și de origine maternă, începe să transcrie și treptat predomină asupra informației materne, depozitată în ovul. Are loc totodată așa-numita DETERMINARE PRIMARĂ. Dacă inițial zigotul este TOTIPOTENT, de această dată în sensul că primele 2-4 celule rezultate prin diviziune pot deveni embrioni de-sine-stătători, dacă sunt separate, pe măsură ce diviziunile de clivaj se desfășoară, capacitatea de totipotență diminuează progresiv, intervenind mai întâi o *determinare primară* ce direcționează celulele spre anumite specializări mai largi de tip **ectoderm, mezoderm, endoderm.** Urmează apoi o DETERMINARE FINĂ, deci mai profundă, care va duce în final la DIFERENȚIERE cu SPECIALIZARE STRICTĂ. Astfel, din celule ectodermului — stratul celular exterior al embrionului — pot să se diferențieze celulele *epidermale* (ce devin specializate în sinteză de keratină și colesterol), *melanocite* (specializate în sinteză de melanină) și *neuroni* (specializați în sinteză de lipide și acetilcholină). Din celulele endodermului — foița embrionară internă, ce delimitează cavitatea gastrică — se vor diferenția celulele *glandelor salivare* (specializate în sinteză de ptialină), celule *pancreatice* (specializate în sinteză de tripsină, nucleaze și insulină), celulele *tiroidei* (specializate în sinteză de tiroxină) etc. Din celulele mezodermului — foița embrionară dintre ectoderm și endoderm — se vor diferenția celule *musculare* (specializate în sinteză de miozină), *eritrocitele* (specializate în sinteză de hemoglobină), *gonadele*, țesuturi conjunctive (specializate în sinteză de mucoproteine, colagen și elastină). Se admite că determinarea primară are la bază acțiunea unor molecule determinative de natură proteinică sau ribonucleică, prezente „ab initio", în citoplasma ovulului. Acestea ar exercita un fel de influențe materne, prin concentrarea lor în anumite regiuni ale citoplasmei zigotului, determinând primar diferitele celule rezultate în urma diviziunii zigotului. Este, de fapt, o predeterminare a acestor celule, deoarece, înainte de a intra în diviziune, zigotul prezintă în citoplasma sa o distribuție neuniformă, dar nu întâmplătoare, a unor asemenea molecule determinatoare.

Rolul citoplasmei în procesul diferențierii celulare a fost dovedit încă din anul 1933, de către H. Spelmann, într-o experiență devenită clasică și pentru care a primit Premiul Nobel: înainte de prima diviziune de segmentare, oul unui triton a fost strangulat cu un fir de păr de cal, foarte subțire, rezultând două jumătăți, una cu nucleul zigotic, celalaltă lipsită de nucleu, dar care încă mai comunicau între ele la nivelul strangulației. S-a menținut strangularea astfel ca partea nucleată să se dividă de 4 ori, rezultând 16 nuclei, moment în care s-a slăbit strangularea, pentru a se permite trecerea unuia din cei 16 nuclei în partea enucleată și apoi strangularea a fost desăvârșită. S-a constatat că dintr-o asemenea celulă „reconstituită", în urma desfășurării în continuare a embriogenezei, rezultă un individ normal. Această experiență a dovedit că și în faza de 16 celule, nucleii rezultați din diviziunile de clivaj ale nucleului zigotic sunt totipotenți, adică echivalenți cu nucleul zigotic inițial, iar citoplasma păstrează încă toți factorii determinării diferențierii celulelor normale.

Distribuția neuniformă în citoplasma zigotului a factorilor determinatori, care condiționează evoluția în direcții diferite a celulelor rezultate din diviziunea zigotului, a fost dovedită și la zigotul unei ascidii **Styela partita**. Zigotul acestei ascidii conține 5 zone citoplasmatice diferit colorate în galben, cu variate dungi gri, care pot fi urmărite în cursul embriogenezei, constatându-se că fiecare dă naștere la diferite primordii de organe. Lezarea oricăreia din aceste zone conduce la apariția unor organe anormale.

La embrionii de arici de mare s-a constatat că celulele care au moștenit citoplasma din jumătatea vegetativă a oului vor deveni totdeauna celule endodermale din stomac și intestin, chiar dacă sunt îndepărtate unele celule de la polul animal.

Relația dintre aranjamentul materialelor celulare în ovul și morfogeneza ulterioară a fost demonstrată și la amfibieni. În acest caz, redistribuirea vitelusului și lezarea locală a regiunii oului, cunoscută sub numele de semilună cenușie (**grey crescent**) care se formează opus punctului de intrare a spermatozoidului, determină anomalii serioase în dezvoltare.

Cel mai bun exemplu al unei regiuni din citoplasmă care are un efect morfogenetic specific, este cel al plasmei polare de la insecte sau germoplasmei de la amfibieni. În ambele cazuri, o regiune ce poate fi ușor recunoscută din citoplasma de la polul vegetativ al ovulului numită *plasmă germinativă* sau *germoplasmă*, devine asociată cu unul sau doi nuclei rezultați din clivajul timpuriu și este legată în mod specific de formarea celulelor germinale primordiale care vor deveni ulterior fie ovule, fie spermatozoizi. Prin diferite mijloace (iradiere locală UV, centrifugare la turații mici, tehnici de constricție), se poate bloca asocierea nucleilor cu germoplasma și astfel este blocată formarea celulelor germinale. Este o demonstrare clară a relației ce există între o regiune particulară a citoplasmei și un tip distinct de diferențiere celulară. Acest lucru s-a putut demonstra experimental la ovule care sunt celule mari. La alte tipuri de celule, aspectele experimentale sunt îngreunate de dimensiunea mică a lor. Dar acest lucru a putut fi realizat la neuroblastele de lăcustă. Acestea sunt celule ale tubului neural care suferă o serie de diviziuni, în cadrul cărora o celulă fiică devine un alt neuroblast, pe când o a doua celulă fiică devine o celulă nervoasă care nu se mai divide. Exact înaintea fiecărei diviziuni, pe o parte a neuroblastului-mamă se formează o regiune de citoplasmă clară. Celula fiică care primește această regiune citoplasmatică este totdeauna aceea care devine celula nervoasă (neuron). Când a fost rotit fusul de diviziune al neuroblastului, astfel încât a fost alterată poziția relativă a cromozomilor și citoplasmei, s-a constatat că nu este influențată diferențierea neuronului sau neuroblastului fiu, astfel că s-a putut trage concluzia că, într-adevăr, citoplasma și un anumit set de cromozomi, determină diferențierea neuronului, respectiv a neuroblastului. Acest tip de diferențiere celulară în care o celulă fiică se diferențiază într-o celulă cu specializare definitivă — terminală — iar o alta continuă să se dividă ca o celulă tulpinală ("*stem cell*") se întâlnește frecvent la organele adulte ale multor animale. Este foarte probabil ca în toate cazurile de distribuție inegală a citoplasmei celulei-mamă să rezulte celule fiice diferite, aspect remarcat și la celulele epidermale ale frunzelor de monocotiledonate, când iau naștere celulele stomatei.

Repartiția inegală a citoplasmei apare ca un mecanism al citodiferențierii atât la animale, cât și la plante. Nu se știe însă mai nimic despre bazele moleculare ale acestei citodiferențieri, mediate de repartiția inegală a citoplasmei. Numai în cazul plasmei polare și plasmei germinative se pare că prezența ARN în cadrul componentelor sale stă la baza eficienței citodiferențierii.

Ovulul de **Xenopus laevis**, înainte de fecundare, prezintă într-o regiune a citoplasmei sale un material specific care s-a numit *germoplasmă*. În timpul gastrulării, germoplasma se află numai în 5-15 celule care constituie celulele primare germinale. Eliminarea acestora în timpul gastrulării face ca broasca să fie sterilă. Aceasta arată că germoplasma conține o informație derivată de la mamă, care este esențială atât pentru indivizii femeli, cât și pentru indivizii masculi. August Weismann a vorbit la sfârșitul secolului al XIX-lea despre „nemurirea" acestei plasme germinative (idioplasmă/germoplastă), dar abia cercetările de la sfârșitul secolului al XX-lea au validat unele dintre ipotezele sale.

3. AMPLIFICAREA GENICĂ ÎN OVOGENEZĂ

Un exemplu interesant de diferențiere celulară îl reprezintă trecerea ovocitei spre ovulul matur. În ovocitele de **Xenopus**, în stadiul de diploten, toți cromozomii iau o configurație lampbrush, fiind implicați într-o intensă transcriere genică și ARNm produs în acest proces este menținut într-o formă stabilă, în celelalte stadii ale maturării ovulului. Când ovulul este fecundat, acest ARN sintetizat în stadiul cu cromozomi *lampbrush* direcționează multe evenimente în dezvoltarea ulterioară, fapt dovedit în experiențele cu actinomicină D, inhibitor specific al transcrierii genice, dar care nu afectează sinteza proteinică sau dezvoltarea normală a embrionului, până în stadiul de blastulă (6.000-15.000 celule), celula având deja rezerve de ARN. La mamifere însă, nucleul zigotic începe sinteza ARNm, încă din stadiul de 2-4 celule.

La **Xenopus**, în stadiul de pachiten al profazei meiotice se înregistrează un fenomen foarte interesant și anume acela de amplificarea genelor ribozomale, când se sintetizează peste 1500 de copii ale acestor gene. Aceste copii formează *corpul ADN*, prin a cărei dispersie rezultă 1000-1500 nucleoli extracromozomali angajați în sinteză intensă de ADNr. Se cunosc și cazuri în care copii ale genelor nucleare care codifică ARNr 18S și 28S din ovocite, sunt eliberate, formând mici cromozomi care vor fi reținuți în nucleu sau vor fi eliminați în citoplasmă, unde continuă să fie transcrise. La **Dytiscus**, acest corp ADNr s-a numit **corpul Giardina.**

Numărul de gene redundante pentru ARNr dintr-o celulă somatică obișnuită de la **Xenopus** este de 450 și se află la nivelul organizatorului nucleolar, implicat în codificarea ARNr 18S și 28S. În ovocita de **Xenopus** însă, acest nivel de redundanță a genelor ribozomale nu este suficient pentru îndeplinirea integrală a rolului acestei celule. Ca urmare, are loc fenomenul de amplificare a genelor ribozomale, care duce la un număr de peste 24.000 de gene ARNr per genom. Această amplificare din ovocită va fi urmată, în dezvoltarea ulterioară a zigotului, de revenirea la nivelul obișnuit de redundanță, specific celulelor somatice.

Un aspect interesant al ovocitelor în general și al amfibienilor în special este prezența unei cantități mult mai mari de ADN în citopasmă, față de conținutul de ADN nuclear. O parte din acest ADN citoplasmatic este asociată cu plachetele viteline, dar funcția sa este necunoscută. Cea mai mare parte a ADN citoplasmatic al ovocitei este însă de origine mitocondrială, în ovocite fiind stocate numeroase mitocondrii, ovocitele mature fiind inactive transcripțional și translațional. Ribozomii și ARNm în ovulul nefecundat sunt cuplați cu o proteină fiind stocați în această formă (informosomi) rezistentă la acțiunea RN-azelor. După fecundație, proteazele devin active, digeră proteina acestora și astfel, ele este permisă traducerea. Tot după fecundare, este adăugat poli-A, la unele tipuri de ARNm matur, localizate în citoplasmă, și astfel pot fi traduse. Ovulul amfibienilor aflat în dezvoltare conține o proteină ușor acidă, desemnată O^+, sintetizată în timpul ovogenezei și depozitată în citoplasma ovulului. În stadiul de blastulă mijlocie, proteina O^+ pătrunde în nucleu, unde activează transcrierea genelor ai căror produși determină trecerea embrionului în stadiul de gastrulă. Femelele homozigote O/O pentru gena mutantă a acestei proteine nu produc proteina O^+ și ovulelele lor fecundate nu gastrulează. Materialul genetic propriu al viitorului individ este activat prin utilizarea produșilor genici stocați precum proteina O^+ și prezența substanțelor morfogenetice asimetric distribuite, astfel că dezvoltarea individului intră treptat sub controlul propriului genom.

Ribozomii sintetizați în timpul primei diviziuni meiotice se acumulează în ovul sub formă de ribozomi materni care vor reprezenta ribozomii funcționali în zigot. O situație similară se înregistrează și la pești.

La gasteropodul **Ilyanassa obsoleta**, prima diviziune de segmentare a zigotului este însoțită de proeminarea citoplasmei vegetative sub forma unui lob. Acest lob rămâne legat la unul din blastomere și acesta reprezintă celula inițială din care derivă mezodermul. Îndepărtarea acestui lob conduce la apariția de larve lipsite de mezoderm și asemenea larve sunt anormale, lipsindu-le gura, piciorul și glanda cochiliferă. Aceasta înseamnă că în citoplasma lobului se află factori care condiționează funcționarea normală a genelor ce dețin informația genetică pentru diferențierea mezodermului.

4. FUZIUNEA DE CELULE ȘI DESCIFRAREA MECANISMELOR DE REGLARE A ACTIVITĂȚII GENICE

Experiențele de fuziune de celule în stadii diferite ale ciclului celular, de exemplu între celule interfazice și celule aflate în diviziune, au demonstrat influența citoplasmei celulei aflată în diviziune asupra nucleului celulei interfazice, exprimată prin condensarea precoce a cromatinei nucleului interfazic, sub forma unor filamente unicromatidice, dacă celula interfazică este în G_1 sau mono și bicromatidice, dacă celula interfazică este în S și bicromatidice, dacă aceasta este în G_2. Fosforilarea histonei H_1 se pare că joacă un rol important în condensarea cromatinei ce conduce la individualizarea cromozomilor.

Dovada faptului că nucleul celulelor specializate continuă să poarte toată cantitatea de informație ereditară este adusă și de experiențe de hibridare celulară prin care s-a realizat fuziunea de fibroblaste de șoarece cu eritrocite de găină. Nucleii eritrocitelor de găină sunt foarte condensați și inactivi în transcriere, iar înainte de a fi complet blocați prin heterocromatinizare, au fost specializați aproape exclusiv în transcrierea informației pentru sinteza hemoglobinei (mamiferele realizează specializarea eritrocitului în sinteza hemoglobinei prin sinteza unui ARNm pentru hemoglobină, de lungă durată, după care nucleul este eliminat). Din această fuziune rezultă un heterocarion care conține citoplasmă de fibroblast de șoarece, un nucleu de fibroblast de șoarece și un nucleu de eritrocit de găină, eritrocitul de găină conținând foarte puțină citoplasmă. După formarea heterocarionului, nucleul de eritrocit de găină pierde aspectul heterocromatic și, autoradiografic, s-a dovedit că devine activ în transcriere, transcriind însă nu genele pentru hemoglobină ci gene pentru activitățile generale de întreținere a celulei cum ar gena pentru pirofosforilaza acid-inosinică, implicată în sinteza ribonucleotidică.

5. MOZAICISM SEXUAL

Embriogeneza la **D. melanogaster** oferă multiple aspecte ale citodiferențierii. Analiza cazurilor de mozaicism sexual la drosofilă arată că în embriogeneza timpurie, la această insectă, apar evenimente de determinare foarte specifică. Mozaicismul sexual sau *ginandromorfismul* caracterizează indivizi care conțin un amestec de celule femele (XX) și de celule mascule (XO) și apare în urma eliminării timpurii a unui cromozom X, în timpul primelor diviziuni de segmentare ale unui nucleu zigotic XX. Această eliminare este stimulată, atunci când un cromozom X poartă o inversie care face ca aceasta să capete formă inelară și astfel să fie instabil, apărând dereglări în funcționarea centromerului său și atașarea la fibrele fusului de diviziune.

Prin încrucișarea unor masculi care poartă mutații recesive X-lincate (ochi albi — X^wY sau culoarea galbenă a corpului X^yY) cu femele normale $X^{w+}X^{w+}$, respectiv $X^{y+}X^{y+}$, apar în descendență, pe lângă indivizi femeli normali fenotipic, dar heterozigoți ($X^{w+}X^w$, respectiv $X^{y+}X^y$) și indivizi ginandromorfi, deoarece, în urma pierderii unui cromozom X, trăsăturile recesive sunt exprimate în stare hemizigotă, în zonele corpului ale cărui celule au rezultat din diviziunea celulei XO. În restul corpului, caracteristicile fenotipice vor fi normale, celulele rezultate din celula inițială care nu a pierdut cromozomul X, fiind heterozigote, în ele exprimându-se alelele dominante y^+, respectiv w^+, conferind părții corpului unde se află fenotip sălbatic, normal.

Evenimentele desfășurate în primele etape ale embriogenezei sunt deci determinatoare asupra întregii evoluții ontogenice a individului.

În cromozomul X, de la **D. melanogaster** s-a evidențiat existența unui locus genic care s-a numit locusul *Notch*. Deficiențele în acest locus genic ca și mutațiile punctiforme ale sale interferă cu citodiferențierea, condiționând apariția unui sindrom bizar, la organismele hemizigote sau homozigote, reprezentat de o creștere de 3 ori a dimensiunii sistemului nervos central, pe seama nașterii de celule ectodermice care, în mod normal, ar fi dat naștere la ectoderm, glande salivare și organe respiratorii.

6. DETERMINAREA ȘI TRANSDETERMINAREA

Studiind fenomenul citodiferențierii la **D. melanogaster**, E. Hadorn (1968) a realizat transplante ale discurilor imaginale. În embriogeneza timpurie a drosofilei are loc o separare a două linii celulare, una care se diferențiază continuu, dând naștere diferitelor organe ale larvei, alta care nu se diferențiază, rămânând în stare embrionară și dând naștere *discurilor imaginale*, astfel că, atunci când larva se transformă în pupă, aceste câteva sute de celule nediferențiate ale discurilor imaginale încep să se diferențieze în țesuturi caracteristice ale insectei adulte (*histogeneza*), pe când celelalte țesuturi ale pupei suferă *histoliză*.

Ceea ce pare stabil în citodiferențierea celulei eucariote este capacitatea de a se diferenția într-un anumit sens ("starea de determinare") și nu starea diferențiată, prin ea însăși. Diferența dintre determinare și diferențierea propriu-zisă poate fi exemplificată cel mai bine cu ajutorul rezultatelor obținute de Hadorn (1968).

Transplantând regiuni ale discurilor imaginale de la o larvă, în cavitatea abdominală a altei larve, Hadorn a remarcat că celulele transplantate, în momentul metamorfozei spre pupă, dau naștere unor organe caracteristice pentru care acestea au fost determinate. Dacă se transplantează celule ale discurilor imaginale determinate să devină ochi, în abdomenul gazdei vor apare ochi normali, iar dacă aceste celule fuseseră determinate să devină antene sau picioare, ele vor da naștere la antene sau picioare. Din această experiență, s-a tras concluzia că în cursul dezvoltării larvare, CELULELE DISCURILOR IMAGINALE, DEȘI NEDIFERENȚIATE, SUNT STRICT DETERMINATE într-o direcție foarte exactă, strictă. Prin aceasta se poate face distincția netă între **determinare** — bazată pe stabilirea unui anumit program al diferențierii celulare — și **diferențiere** propriu-zisă — care înseamnă ducerea la îndeplinire a acestui program.

Dacă asemenea celule ale discurilor imaginale sunt direct transplantate în hemocelul unui adult, trecând deci peste fază de pupă, ele se divid indefinit, nediferențiindu-se. Dacă asemenea celule, după al 160-lea pasaj în adulți, timp de 6 ani, sunt transplantate din nou la o larvă aflată însă la trecerea spre pupă, ele vor suferi o diferențiere normală în conformitate cu programarea lor din etapa de determinare, dând țesuturi și organe normale. Aceasta înseamnă că ele au păstrat nealterate instrucțiunile pentru care ele au fost inițial determinate.

Starea de determinare s-a dovedit a fi stabilă, de vreme ce aceste discuri pot fi trecute printr-o serie de grefe, în hemocelul adultului, timp de câteva sute de generații, fără a se diferenția.

Din această constatare se poate trage concluzia că starea de deteminare este necesară, dar pentru a se realiza diferențierea celulară sunt cerute condiții specifice de micromediu celular. Determinarea reprezintă doar o etapă, e drept esențială, a diferențierii celulare, doar că trebuie să beneficieze de condiții specifice care să permită definitivarea citodiferențierii, adică realizarea specializării celulelor.

Astfel, dacă după un pasaj pe o larvă, aceste celule vor fi transplantate pe o altă larvă, aflată în același stadiu larvar sau aflată într-un stadiu mai timpuriu, vor fi alterate instrucțiunile de determinare, realizându-se o reprogramare a determinării, într-o altă direcție, asemenea celule dând naștere unui alt organ, decât cel pentru care inițial fuseseră determinate. Acest fenomen de modificare a determinării a primit denumirea de TRANSDETERMINARE. De exemplu, din celule determinate spre a da organe genitale derivă capul sau picioarele insectei, la un prim pasaj, iar dacă are loc un al doilea pasaj, să derive aripile etc. Și transdeterminarea apare a fi direcționată, deoarece niciodată din celule care au fost determinate spre a da organe genitale nu vor deriva decât aripile, prin pasajul intermediar, pe o altă larvă. Ritmul rapid al diviziunii acestor celule transdeterminate condiționează o mai mare posibilitate a schimbării programului de determinare a celulelor transplantate, ceea ce sugerează că **prin diviziune celulară apar modificări în distribuția factorilor implicați în determinare.**

7. *ELEMENTE GENETICE TRANSPOZABILE* ȘI REGLAREA ACTIVITĂȚII GENICE

Descoperite de către Barbara McClintock, în anul 1935, la porumb, aceste *elemente genetice transpozabile* s-au dovedit a fi elemente reglatoare prin schimbarea localizării lor în genom, într-o generație fiind pe un cromozom, pe când în altă generație fiind găsite într-o altă poziție, în același cromozom sau chiar într-un alt cromozom. Deoarece ele își schimbă poziția în genom, s-au numit *elemente genetice transpozabile.*

Printre elementele transpozabile la porumb, s-a descris locusul *disociator* (**Ds**), locusul *activator* (**Ac**) și locusul *dotted* (**Dt**). Integrat într-o poziție dată a cromozomului, elementul Ds represează genele adiacente de o parte și de alta a sa, determinând apariția în fenotip a unei *variegări* a frunzelor sau cariopselor. Se admite că *elementul Ds* ar fi un segment de heterocromatină ce are proprietatea de a se insera în diferite puncte ale cromozomilor. Efectul represiv exercitat de către elementul *Ds* asupra eucromatinei adiacente este dependent de prezența în genom a altui element numit *activator* (Ac) care, prin el însuși, nu are efect asupra genelor cu care se învecinează, dar și el suferă transpoziție. Acumularea unui număr mare de elemente *Ac* are efect represiv asupra lui *Ds*. Nu se cunoaște natura exactă a acestor elemente, precum și a relației dintre ele, deși ele au fost secvențiate. Se crede că *Ds* ar fi un element de control analog unui operator instabil, iar interacția Ac-Ds este imaginată ca un relict al unei interdependențe, cândva normale, de tip reglator-operator.

Tot un element de control apare și elementul *dotted* (*Dt*) care condiționează apariția de pete colorate pe suprafața incoloră a cariopsei și care influențează gena ce dirijează sinteza unei proteine implicate în biosinteza antocianinei.

Elemente genetice mobile ar putea fi implicate și în realizarea unor rearanjamente sau remanieri programate a cromozomilor la eucariote, rearanjamente care stau la baza reasocierii de segmente genice disparate, în vederea constituirii unor gene funcționale, așa cum este cazul imunoglobulinelor, în cadrul cărora relația o genă — o catenă polipeptidică devine două gene — o catenă polipeptidică.

8. DESTRUCȚIA GENICĂ PROGRAMATĂ ȘI RAPORTURILE CU APOPTOZA

După cum histogeneza este realizată prin funcționarea programului genetic, tot astfel și histoliza este programată genetic. În cadrul histolizei, distrugerea organelor, țesuturilor și celulelor este însoțită de distrugerea genelor aflate în materialul genetic al acestora.

Nu se cunosc încă mecanismele genetice implicate în procesul destrucției genice. Genele care funcționează într-o etapă dată a ontogenezei vor fi inactivate sau chiar distruse într-o altă etapă a ontogenezei. Astfel, la trecerea de la mormoloc la adult, coada mormolocului de broască este resorbită. Tot astfel, în metamorfoza insectelor, trecerea de la larvă la adult implică autoliza organelor larvare și implicit a materialului lor genetic, în stadiul de pupă.

În desfășurarea meiozei la organismul femel, în ovogeneza animalelor și macrosporogeneza plantelor, trei din cei patru produși ai meiozei sunt nefuncționali și se resorb. Celulele hrănitoare din ovarul unor specii de animale sunt unite prin canale cu ovocitele, spre a le hrăni pe acestea din urmă. Pe măsura dezvoltării ovocitelor, aceste celule hrănitoare sunt lizate și conținutul lor este transferat ovocitei. Spermatocitele lăcustei **Melanoplus differentialis**, din anumite tuburi testiculare, sunt lizate probabil în scopuri nutriționale. Există și cazuri de eliminare de gene, așa cum se întâmplă la eritrocitele mature de mamifere, fără ca această eliminare a întregului nucleu să însemne moartea imediată a celulei. În acest caz, programul genetic al celulei este trecut sub formă de mesaj genetic — cel puțin pentru funcția de bază a eritrocitului (sinteza de hemoglobină) — în ARNm pentru globină.

Vasele conducătoare lemnoase ciuruite (xilem) de la plante sunt funcționale în transportul lichidelor, după ce au pierdut nucleii. În cazul vaselor liberiene (floem), celulele care se vor diferenția în asemenea vase liberiene, deși pierd nucleul, rămân vii și cresc. Aici apare un interesant proces de interrelații celulare. Aceste vase conducătoare liberiene rămân în legătură cu celulele anexe al căror nucleu ar putea fi considerat a reprezenta copia nucleului celulei floematice, de vreme ce, atât celula floematică cât și celula anexă provin din aceeași celulă-mamă.

S-a constatat că limfocitele, în mod spontan sau când sunt stimulate cu fitohemaglutinină sau antigen, elimină ADN.

Există și cazuri de pierdere parțială de material genetic. Astfel, la insecta **Parlatoria** se pierd cromozomi întregi, iar la **Cyclops** și **Ascaris** se pierd părți din cromozomi. La **Ascaris megalocephala** apare și fenomenul de *diminuare cromozomală*. Diviziunea zigotului acestui vierme cilindric duce la nașterea a două celule. În una din aceste celule se păstrează complementul cromozomal alcătuit din doi *cromozomi policentrici* (cu multipli centromeri), pe când în cealaltă celulă se remarcă o fragmentare a celor doi cromozomi policentrici, rezultând 50-70 minicromozomi. Celulele se divid în continuare. Din celula cu complementul cromozomal normal, reprezentat de cei doi cromozomi policentrici, va lua naștere țesutul germinal, pe când din celula cu cromozomi fragmentați vor lua naștere celule ale somei (corpului), cu o repartizare neechilibrată a cromozomilor, segmentele cromozomale acentrice (lipsite de centromer) pierzându-se.

La insectele diptere din genul *Sciara* are loc fenomenul de *eliminare de cromozomi*. În acest caz, în celulele liniei germinale se află cromozomi mari, heterocromatici. Din unele celule, acești cromozomi, sunt eliminați, la a patra diviziune de segmentare a zigotului la *Cecidomydae*, iar la *Wachtliella* se elimină din cei 48 de cromozomi 30, în 7 din cele 8 celule ale embrionului. Celulele din care sunt eliminați cromozomii vor deveni celule somatice, pe când celula care păstrează intactă garnitura de cromozomi asigură continuitatea liniei germinale, păstrând întregul program genetic al speciei.

La măceș (**Rosa canina**) are loc eliminarea de cromozomi, în microsporogeneză.

La ciliate, precum **Paramecium,** în condiții de înfometare, fragmentele macronucleare care iau naștere după conjugare, sunt selectiv degradate, iar ADN-ul lor este folosit în organizarea noului macronucleu. Tot astfel, la alt ciliat — **Stylonychia** — circa 93% din ADN macronuclear este degradat, restul de 7% formând prin endoreduplicare un nou macronucleu. La țânțarul **Aedes aegypti,** până la 41% din ADN prezent în larve este eliminat în stadiul de pupă.

La trecerea de la semințele germinate de grâu la stadiul de plantulă, au loc modificări în conținutul G + C, ca și în cantitatea totală de ADN, semn al unor modificări metabolice ale acestui material genetic.

Fenomene de pierdere de material genetic au fost descrise și la procariote, dar în acest caz, dată fiind redusa lor reiterare genetică, pierderea presupune mai ales fragmente de ADN participante sau nu în transformare și conjugare.

Complexitatea mai mare a organismelor eucariote a impus diversificarea și complexificarea mecanismelor de reglaj genetic.

Destrucția genică programată reprezintă un mecanism care este intim legat de moartea celulară programată genetic — apoptoza. La rândul său, apoptoza este un mecanism complex de finisare a organismului pluricelular prin sacrificarea anumitor componente — celule ale sale sau de apărare a integrității structural — funcționale a acestuia, atunci când este compromisă integritatea genomului anumitor celule, sub acțiunea unor agenți mutageni clastogeni.

CAPITOLUL XIII

BIOLOGIA MOLECULARĂ A DEZVOLTĂRII EMBRIONARE

1. GENERALITĂȚI

Toate plantele și animalele multicelulare cu reproducere sexuată pornesc în dezvoltarea lor de la celula-ou sau zigot, celula inițială care are în nucleul său întreaga informație genetică a speciei. Organismul pluricelular este alcătuit dintr-o mare varietate de tipuri celulare. De exemplu, la un mamifer se diferențiază celule nervoase, celule musculare, celulele tiroidei, celulele elementelor figurate ale sângelui etc. Aceste tipuri celulare trebuie să apară pe o cale extrem de ordonată, dintr-o aceeașI celulă inițială. La unele organisme, specializarea începe de la primele diviziuni celulare ale zigotului. La alte organisme, un număr mare de diviziuni apar înainte ca acestor celule să li se fixeze destinul lor de țesut și organ.

Indiferent de momentul exact în care apare diferențierea, aceasta duce la transformarea celulei inițiale într-un număr mare de tipuri celulare progene.

Zigotul este el însuși o celulă foarte specializată, îndeplinind funcții specifice pe care nu le poate îndeplini nici o celulă matură.

Gameții nu pot supraviețui dacă nu se realizează fuziunea celor de sex opus, ei neputându-se divide în mod normal și mor:

– ovulul datorită echipamentului enzimatic excesiv, cu acțiune hidrolitică;

– spermatozoidului datorită sărăciei sale în citoplasmă. Cazurile de partogeneză (ginogeneză sau androgeneză) sunt rare în natură și se întânesc, de regulă, în regnul vegetal, androgeneza fiind întâlnită în exclusivitate la plante.

– când se unesc în procesul de fecundație, ovulul și spermatozoidul se potențează reciproc, generând zigotul, punct de plecare în dezvoltarea unui nou organism.

Diviziunile succesive ale zigotului, numite diviziuni de clivaj, au ca rezultat formarea a numeroase celule. Ele suferă mai întâi **determinare exactă**, chiar din primele faze ale dezvoltării embrionare, dând naștere la clone celulare care apoi vor suferi DIFERENȚIERE, spre a deveni celule hepatice, renale, neuronale etc.

Imediat după fecundație, ovulul de broască suferă 12 diviziuni de clivaj, foarte rapide, caracterizate prin perioade foarte scurte de interfază, când sinteza ADN apare cu o rată foarte accelerată.

Diferențierea este cel mai adesea ireversibilă, la nivelul celulei ca întreg. Crescută fiind pe mediu de cultură, celula diferențiată nu mai poate să sintetizeze alte proteine decât cele întâlnite în ea. Diferențierea nu se datorează, de regulă, pierderii sau câștigului de cromozomi, ci reglajului activității genice. La nivel nuclear, diferențierea este de regulă reversibilă, așa cum s-a dovedit prin experiențe de transplant nuclear.

ÎN PROCESUL CITODIFERENȚIERII SE RELEVĂ EXISTENȚA UNEI **MEMORII CELULARE** care face ca o celulă determinată primar într-o anumită direcție să sufere o diferențiere ulterioară, corespunzătoare direcției în care a fost determinată. MEMORIA CELULARĂ, spre deosebire de memoria engramatică a sistemului nervos, nu este afectată de diviziunea celulară. Starea de determinare, respectiv de diferențiere, se menține chiar dacă are loc diviziunea celulară. Dimpotrivă, în cazul neuronului, diviziunea celulară ar destrăma engramele. În consecință, pentru păstrarea engramelor sale, NEURONUL NU SE MAI DIVIDE.

Replicarea semiconservativă asigură ca fiecare celulă — fiică să primească copii identice ale fiecărei gene, dar secvențele genice nu pot, prin ele însele, să specifice dacă o genă trebuie să funcționeze sau să fie scoasă din funcțiune. Acest fapt se realizează printr-o multitudine de mecanisme:

– factori reglatori difuzibili;

– modificări covalente nedifuzibile ale ADN (metilarea dinucleotidului CpG);

– modificări locale ale proteinelor cromozomale, din regiunile active sau inactive ale cromozomului.

Oricare dintre aceste mecanisme poate să contribuie ca fiecare celulă fiică să moștenească un model caracteristic de gene active sau inactive.

Nu știm ce se întâmplă la nivelul bifurcației de replicare și anume, dacă proteinele legate de duplexul parental rămân asociate cu gena, în momentul în care aceasta este replicată.

S-ar putea ca unele, dar nu toate proteinele, să rămână slab legate la coloana glucido-fosforică a monocatenei ADN (matriță), pe când bazele acesteia sunt utilizate ca matriță de către ADN-polimerază, pentru sinteza replicei. Ele apoi s-ar uni strâns la duplexurile fiice. Aceasta ar explica posibilitatea perpetuării stării active sau inactive a genelor, în timpul diviziunii celulelelor diferențiate.

Metilarea ADN însoțește, de regulă (există și excepții), starea de diferențiere, cele mai multe gene active sau potențial active sunt submetilate, la nivelul secvențelor CpG.

Diferențierea citoplasmatică ireversibilă, însoțită de pierderea capacității de a se divide, este întâlnită în reticulocite — celule ale sângelui la păsări. La mamifere, nucleii unor asemenea celule sunt dezintegrați, celulele fiind astfel specializate doar în sinteza hemoglobinei. Același lucru se întâmplă în celulele adulte ale plasmei, care produc anticorpi specifici: ele nu se divid, produc anticorpi specifici, câteva zile, după care mor. Se poate deduce faptul că *diviziunea celulară este o condiție sine-qua non a VIEȚII*. Excepție fac neuronii care, deși nu se mai divid, trăiesc mai muți ani, nucleul lor fiind funcțional doar în transcrierea genică, sintetizând ARN implicat în toate procesele celulare, incluzând, în acest caz, și procesele memoriei. O oarecare sinteză de proteine are loc la nivel foarte scăzut (bazal), pentru funcționarea continuă a tuturor celulelor. Această sinteză poate înlocui proteinele îmbătrânite care constituie ținta destrucției de către sistemul proteolitic, dependent de ATP și ubiquitină. Starea de senescență celulară se instalează atunci când sistemul de eliminare a proteinelor alterate nu este eficient.

Complexele stabile de transcriere, sintetizate pe matriță de ADN, la nivelul genelor, de către toate cele trei ARN polimeraze eucariote, reprezentând transcriptele asociate cu factorii lor de transcriere, constituie asociații stabile cu ADN și de îndată ce factorul de transcriere se leagă stabil la genă, atunci acel locus particular este activat și poate fi transcris repetat de către ARN polimeraza III. Același lucru este valabil pentru ARN polimerazele I și II.

Astfel, *complexele de transcriere oferă un mecanism posibil de menținere a stării de diferențiere în interfază*, adică între diviziunile celulare succesive. Transcrierea și replicarea, însă, nu pot avea loc simultan.

Nu toate celulele dau naștere prin diviziune la celule identice. Celulele tulpinale — celulele **stem-line** — se divid cel mai adesea asimetric, așa cum este cazul liniei tulpinale hematopoietice, rezultând o celulă fiică care continuă linia tulpinală și alta care evoluează spre eritrocit. Acesta va trăi 120 de zile, după care moare, fiind înlocuit cu alte eritrocite. Splina este considerată „cimitirul eritrocitelor bătrâne".

ARN polimeraza III are un factor de transcriere TF III care se leagă preferențial la catena codificatoare a genei pentru ARNr 5S și poate rămâne legat chiar în timpul replicării. Cromozomul-fiu care va moșteni această catenă parentală de ADN, va moșteni și factorul și, odată cu el, și gena în stare activă transcripțional. Catena care este necodificatoare și care va merge în celălalt cromozom-fiu, va moșteni gena în stare inactivă. Aceasta poate fi împachetată în nucleosomi și astfel poate fi represată.

Segregarea conservativă a nucleosomilor parentali, la nivelul bifurcației de replicare, oferă un alt mecanism pentru generarea a două celule, dintre care doar una are gena activă.

Remanierile cromozomale legate de diferențierea celulară se întâlnesc atât la eucariotele unicelulare cât și la cele pluricelulare. În cursul ciclului de viață, la Ciliate apar extensive rearanjamentele de ADN, mai ales în evoluția macronucleului, cu extensive destrucții genice.

Rearanjamente de gene s-au evidențiat și la alterarea antigenului proteinelor flagelare (*flagelline*) de la bacteria **Salmonella**, alterare realizată printr-o inversie a unui segment specific de ADN ce conține promotorul.

La porumb (**Zea mays**) și musculița de fructe (**Drosophila melanogaster**) se constată inactivarea genelor prin inserția unui element transpozabil între gena structurală și promotorul său și transpoziția unui promotor la o genă structurală.

Rearanjament genic prin care o genă structurală este activată prin deplasarea ei spre propriul promotor este întâlnit la **Saccharomyces cerevisiae** și se numește **modelul casetei.** Două tipuri de împerechere sunt prezente la drojdia haploidă și ele sunt desemnate α și *a*. Tipul α este controlat de locusul HM α, iar tipul *a* este controlat de locusul HMa. În cursul procesului sexual, o celulă haploidă α fuzionează cu o celulă **a**, rezultând o celulă diploidă **αa.** Nu pot fuziona celule de același tip sexuat (***mating type***) decât foarte rar, dând celule diploide **αα** sau **aa.**

Locii genici **HMα** și **HMa** sunt neomologi și reprezintă fiecare un cluster genic ce conține cel puțin două gene. Ei se află localizați în același cromozom, dar nu adiacent, ci la o oarecare depărtare, fiind deci loci genici nealelici.

Fiecare celulă haploidă posedă ambii loci genici HMα și HMa, dar numai unul dintre ei este activ, adică exprimat, astfel că la un moment dat, oricare celulă poate fi ori de tip sexuat α, ori de tip sexuat *a*. Ocazional însă, celula de tip α se convertește spre tipul **a** și vice versa. Conversia α®a sau a®α s-a numit INTERCONVERSIA TIPULUI DE ÎMPERECHERE.

Fenomenul de interconversie are loc numai dacă celula conține o genă HO. Celulele cu genotip **HO** se numesc HETEROTALICE, ceea ce înseamnă că ele pot să-și schimbe genotipul sexual. Există mutația acestei gene desemnată **ho**$^-$ care face ca celula să fie **homotalică**, având un genotip stabil, neputând realiza interconversia tipului de sexualitate (***mating type***).

Modelul de expresie genică a tipului de împerechere (***mating type***) de la *S. cerevisiae* s-a numit MODELUL CASETEI.

În mod curent, genele HMα și HMa ocupă poziții distincte, între locii ocupați de ele existând o regiune a cromozomului la nivelul căreia se află locusul tipului de împerechere, reprezentând situsul țintă sau caseta în care se poate insera fie blocul genic HMα, fie blocul genic HMa, după cum, într-un casetofon se poate scoate o casetă și se introduce o altă casetă, cu o altă înregistrare muzicală. Inserția este dirijată de produsul genei HO. Adiacent locusului tipului de împrechere se află un promotor. Când inserția s-a realizat, (fie cu HMα, fie cu HMa) se inițiază transcripția genică a genei inserționate începând, evident, de la nivelul promotorului. Inserția este realizată prin sinteza și mobilizarea unei copii (fie α, fie a), a genei *master*, care rămâne în locusul său din cromozom. Numai gena rezidentă în locusul tipului de împerechere trebuie îndepărtată și eliminată din acesta, înainte de a avea loc inserția unei copii a celuilalt tip de împerechere — proces asemănător *substituției profagului de la bacteriile lizogene.*

Clonarea locusului tipului de împerechere a permis să se dovedească că acesta dirijează sinteza unei enzime care produce „in vitro" o crestare dublu-catenară la nivelul locusului tipului de împerechere.

Un alt tip de rearanjament genic este reprezentat de REUNIREA SECVENȚELOR CODIFICATOARE DIN CADRUL SISTEMULUI IMUNITAR. Este un exemplu tipic de ACTIVARE A EXPRESIEI GENICE, PRIN JUSTAPOZIȚIONAREA DIFERITELOR SEGMENTE DE GENE STRUCTURALE. Organismul uman sintetizează peste 10^6 molecule diferite de anticorpi (imunoglobuline), copresρunzătoare diferiților antigeni. Dacă fiecare moleculă de anticorp ar fi codificată de o genă distinctă, atunci o fracție foarte mare din ADN al unei celule ar trebui să fie folosită pentru sinteza anticorpilor, ceea ce nu se întâmplă în realitate. Rearanjamentele cromozomale au loc în limfocitele B și T și implică translocarea genei pentru regiunea variabilă în imediată vecinătate a genei pentru regiunea constantă a catenei imunoglobulinelor, cele două gene fiind localizate în regiuni diferite ale cromozomului. *Având loc în celulele somatice, asemenea rearanjamente, deși ireversibile, nu pot fi trecute la generația următoare.*

Tripanosomele evită răspunsul imun al gazdei prin modificarea antigenelor de suprafață, ducând la apariția bolii somnului. Glicoproteina de suprafață desemnată VSG (de la *variant surface glycoprotein*) este recunoscută de către sistemul imun al gazdei ca un antigen străin și fabrică anticorpi împotriva sa, spre a ținti parazitul, în vederea distrugerii acestuia. Dar, parazitul schimbă mereu acest VSG, cu un VSG neînrudit antigenic. Schimbarea este rapidă și cotinuă, încât lupta sistemului imunitar al gazdei ca parazitul nonself va fi epuizantă, organismul atacat eșuând în a da un răspuns imun eficient. Genomul flagelatului parazit **Trypanosoma** conține un repertoriu de circa 1000 de gene VSG diferite. Genele VSG sunt activate și înlocuite la nivelul unor situsuri de expresie telomerică. Mai mult de trei cromozomi au gene telomerice VSG, dar numai situsul de expresie este activ transcris. În cursul infecției, conversiile genice direcționate înlocuiesc una sau mai multe dintre genele VSG telomerice, cu noi gene, variante, născute din copiile de bază, păstrate în situsurile lor din alți cromozomi și care sunt de regulă silențiate transcripțional. Apoi, în cursul primei recăderi, o nouă variantă VSG este exprimată, pe când vechiul situs de expresie telomerică este blocat, fiind activ un nou situs. O strategie tot atât de „perfidă" o adoptă și virusul SIDA (HIV1).

La **Tetrahymena** apare o neobișnuită excizie și amplificare a genelor care codifică pentru ARNr, pe când, la **Drosophila**, genele corionului pot fi amplificate, fără excizie.

Un rol major în comunicarea intercelulară la eucariote îl joacă *„cel de al doilea mesager“* – AMP ciclic, pentru a cărui descoperire, Sutherland a primit Premiul Nobel. AMP ciclic este un morfogen în dezvoltarea lui **Dyctiostelium discoideum** — mucegai din grupa mixomicetelor — ciuperci inferioare. Celula fondatoare a aglomerării este înconjurată de „valuri“, adică de gradiente de cAMP. Ulterior, formarea de contacte intercelulare dintre glicoproteinele suprafeței celulare face ca celulele amoeboidale ale acestei mixomicete — eucariot inferior — să adere una la alta și să se direcționeze spre centru, rezultând masa de celule asociate ale corpului acestei ciuperci inferioare a cărui creștere este atât de rapidă, încât poate fi remarcată cu ochiul liber, frunzele uscate foșnind în pădure, dacă sub ele crește o asemenea mixomicetă.

2. ASPECTELE GENETICE ALE EMBRIOGENEZEI

Cea mai dificilă problemă a embriologilor moderni este aceea de a explica în termeni moleculari cum poate fi trasformată informația genetică reprezentată de o secvență unidimensională de nucleotide din ADN, într-o organizare complexă, tridimensională, a unui organism adult. Embriologii clasici își dăduseră seama că ovulul și spermatozoidul nu sunt în întregime lipsiți de formă și simetrii. Într-un fel oarecare, aceste celule germinale, din unirea cărora ia naștere celula-ou (zigotul), punct de plecare în formarea unui nou organism, trebuie să conțină fie o versiune miniaturizată a planului corpului adultului; fie un mecanism biochimic pentru producerea planului acestui corp, împrospătat cu fiecare generație. La 1700, această concepție a condus la elaborarea teoriei preformismului care susținea că ovulul (după părerea oviștilor) și spermatozoidul (după părerea spermatiștilor) sunt în realitate adulți minusculi, un **Homunculus**, în cazul lui „**Homo sapiens**“. În acest caz, funcția principală a dezvoltării este aceea de a face mai mare această mică creatură, ascunsă în ovul sau spermatozoid. Deși cei de astăzi privesc cu superioritate la aceste speculații, ei trebuie să recunoască faptul că există un oarecare adevăr în ideea de bază a acestei concepții. Știm astăzi că anumite modele (pattern-uri) de dezvoltare sunt preformate în ovul și că alte mecanisme determinatoare ale formei corpului sunt de fapt activate prin fecundație.

La insecte, ca și la amfibieni, embriogeneza timpurie are loc așa de repede, încât nu există suficient timp pentru a avea loc creșterea celulei. În schimb, rostul embriogenezei timpurii este de a diviza oul foarte mare în celule mici, astfel că morfogeneza poate să înceapă. La **Drosophila**, ca și la alte insecte, imediat după fecundație, nucleul zigotic suferă circa 9 diviziuni foarte rapide, rezultând 512 nuclei fără a avea loc celulalizarea, adică separarea citoplasmei oului în celule. Oul devine astfel un sincițiu gigantic, literar sincițiul însemnând o singură celulă umplută cu numeroși nuclei. După cea de a noua diviziune, nucleii migrează spre suprafața oului și se divid sincron, de încă 4 ori. Membrana plasmatică a oului se învaginează, astfel că fiecare nucleu este separat într-o celulă care prezintă membrana celulară. Rezultă astfel **blastodermul**. Plierea complexă a acestui balon elipsoidal de celule dispuse ca un *hallow*, dă naștere la o larvă segmentată numită **instar** care are un cap, trei segmente toracice (T_1-T_3) și opt segmente abdominale (A_1-A_8).

Acest instar este primul din cele trei stadii larvare, separate de năpârliri, ducând la formarea unei creaturi asemănătoare unui vierme care este vorace, mâncând și acumulând suficientă biomasă spre a construi o musculiță adultă. După cel de al treilea instar, larva se împupează, spre a oferi un mediu protector pentru desfășurarea metamorfozei. În cursul metamorfozei, larva digeră multe din țesuturile proprii (histoliză) pe care le înlocuiește cu structuri ale adultului (histogeneză). Totuși, corpul adultului păstrează semnele segmentării stadiilor larvare. Surprinzător apare faptul că organele adultului (picioare, aripi, antene etc.) sunt construite nu din celule larvare diferențiate, ci din grupe mici de celule relativ nediferențiate, care păstrează capacitatea de proliferare și care s-au numit DISCURI IMAGINALE, denumire derivată de la cuvântul **imago** care înseamnă adult. Cele 19 discuri imaginale (9 sub formă de pereche și un disc genital fuzionat) devin distincte foarte de timpuriu, în cursul embriogenezei. Fiecare asemenea disc este destinat să dea organe specifice ale adultului (piciorul stâng, piciorul drept, ochiul stâng sau ochiul drept ș.a.m.d.).

Discurile imaginale rămân într-o stare relativ nediferențiată, spre suprafața corpului larvei, până ce, prin schimbarea nivelului hormonal din cursul împupării, este declanșată diferențierea lor, cu derularea morfogenezei. Astfel, în cea mai mare parte a sa, planul de bază al corpului musculiței este stabilit în cursul embriogenezei, cu mult înainte ca diferențierea discurilor imaginale să creeze structurile cuticulare adulte care învelesc organele interne ale animalului.

Spre a înțelege morfogeneza, biologii moderni încep aproape întotdeauna cu identificarea genelor și produșilor genici care afectează aspectele vizibile ale organismului. Aceasta a fost, de asemenea, strategia utilizată în analiza morfogenezei capsidelor bacteriofagilor lambda și T_4.

Genele dorsalizării de la **Drosophila** sunt bine studiate, permițând înțelegerea mecanismelor care guvernează morfogeneza la eucariotele superioare.

Ovulul nefecundat de la drosofilă, ca și de la alte insecte, este înconjurat de un înveliș al ovulului, înalt structurat, numit *chorion*. Părțile anterioară și posterioară, ca și cele din față și din spate (ventrală și dorsală), sunt ușor de distins.

Această diferențiere externă sugerează că însuși ovulul posedă polaritate antero-postrioară și dorso-ventrală, fapt dovedit prin analiza genetică și biochimică.

Pentru construirea unui ovul cu polaritate dorso-ventrală corespunzătoare sunt necesari produși genici ai cel puțin zece gene diferite. Dacă mama nu are o copie de tip sălbatic a oricărei din aceste zece gene, un embrion dorsalizat nu poate fi refăcut de o singură copie a genei de tip sălbatic (normal), adusă de spermatozoid, în cursul fecundației. Evident, este prea târziu să fie reconstituit oul, utilizând produsul genei de tip sălbatic, adusă de spermatozoid, din această cauză, asemenea genă exercită ceea ce s-a numit EFECT MATERN. Astfel, genotipul tatălui devine complet nerelevant, pentru morfogeneza inițială a embrionului. Pentru mutațiile recesive în cele 10 gene ale dorsalizării, efectele materne sunt observabile numai în ovulele femelei homozigote, la care ambele copii genice sunt defective. Ouălele femelelor de tip sălbatic, sau heterozigote, la care o copie de tip sălabatic poate produce produsul genic normal, sunt complet normale. Aceasta, deoarece, în esență, tot ARNm și factorii prezenți în oul matur sunt produși în citoplasma oului de către 15 celule diploide hrănitoare, sau celulele-doică (**nurse cells**): ARNm dorsal, de exemplu, poate fi identificat în celulele hrănitoare înainte ca el să apară în ovocite. Transcripția din cadrul nucleului haploid al ovulului contribuie puțin, dacă contribuie cu ceva, la stocarea enormei cantități de citoplasmă a ovulului. Aproape întreaga cantitate a ovulului este moștenită din ovogonie, adică de la mamă.

3. POLARITATEA DORSO-VENTRALĂ POATE FI STABILITĂ DE UN GRADIENT MORFOGENETIC.

Aspectul unui embrion deplin dorsalizat este uimitor. Acesta apare a fi în întregime reprezentat de partea din spate (dorsală) și a nu avea partea din față (ventrală). Embrionul nu poate supraviețui, deoarece îi lipsesc structurile **dorso-laterale** cum sunt Filzkörper (tuburile respiratorii) și structurile **ventrale**, așa cum sunt benzile denticulare, șiruri de mici umflături care ajută larva la înot. În schimb, structurile dorsale se extind de jur împrejurul corpului embrionului.

Geneticienii au fost capabili să identifice mutații ale unor asemenea gene care au condus la pierderea unora, dar nu a tuturor structurilor ventrale. Existența unor asemenea embrioni intermediari (parțial dorsalizați) sugerează că polaritatea dorso-ventrală în ovulul nefecundat este definită printr-un gradient de un anumit fel, cel mai probabil molecular. *Sarcina colectivă a diferitelor gene de dorsalizare este de a genera acest gradient, dând posibilitatea celulelor să-și interpreteze poziția lor în cadrul gradientului molecular și astfel să se diferențieze corespunzător determinării pe care au suferit-o mai înainte.*

Surprinzător, mutațiile apărute în unele din cele zece gene ale dorsalizării pot fi parțial sau complet „salvate“, prin microinjectare de citoplasmă luată dintr-un embrion timpuriu, de tip sălbatic, înainte de celularizarea blastodermului. Activitatea de salvare, cel puțin la 5 dintre mutante, apare a fi datorată unor molecule de ARNm. Mai mult, ARN dintr-un embrion mutant, cu defect într-o anumită genă a dorsalizări, va salva un embrion mutant cu un defect în altă genă a dorsalizării și vice-versa. Astfel, fiecare din cele 10 gene ale dorsalizării apare a contribui cu un produs genic distinct la mașinăria moleculară, responsabilă pentru generarea polarității dorso-ventrale.

Deosebit de relevantă este constatarea că salvarea structurilor ventrale în embrionii cu o mutație homozigotă într-una din genele **dorsalizării** are loc numai atunci când este injectată citoplasmă de tip sălbatic, în partea ventrală a embrionului mutant. Aceasta înseamnă că embrionul dorsalizat și-a stabilit deja un gradient de informație pozițională de-a lungul axei sale dorso-ventrale dar, în absența produsului genei dorsale, celulele sûnt incapabile de a intrerpreta poziția lor, în cadrul acestui gradient și să se diferențieze corespunzător. În egală măsură de interesantă este constatarea că injectarea de citoplasmă de tip sălbatic în regiunea posterioară ventrală a unui embrion dorsalizat, acolo unde se formează tuburile respiratorii la tipul sălbatic, salvează Filkörper-ul, pe când injectarea în regiunea mijlocie-ventrală (acolo unde se formează structurile capului, la tipul sălbatic) restabilește organele senzitive ale capului. Astfel, oul matur de drosofilă are stabilit, de asemenea, un gradient al informației poziționale, de-a lungul axei anterio-posterioare. Aceste două gradiente par a fi independente, unul față de celălalt.

Produsul genei **Toll** determină polaritatea gradientului morfogenetic.

Faptul că polaritatea dorsoventrală a oului este determinată de un gradient de un oarecare tip este susținut de comportarea mutațiilor genei dorsalizării, cunoscută ca genă **Toll**. Mutațiile recesive ale acestei gene, ca și cele din celelalte nouă gene ale dorsalizării, produc embrioni lipsiți de structuri ventrale și laterale. Produsul genei **Toll** însă trebuie că se comportă diferit de produșii celorlalte nouă gene, deoarece a fost posibil să se izoleze mutații dominante în **Toll**. Amuzant este faptul că aceste mutații dominante determină ca structurile ventrale să se extindă peste tot, în partea dorsală a embrionului! Aceasta sugerează că produsul genei **Toll** poate fi realmente morfogenul (sau să genereze morfogenul) care face să se formeze structura ventrală. Mutațiile **Toll** dominante (ventralizatoare) vor determina superproducție de produs genic **Toll**, la situsul ventral normal sau are loc expresia necorespunzătoare a produsului genei **Toll**, de-a lungul oului, astfel că celulele sunt puse în situația de a produce structuri ventrale, în locuri greșite.

Experiențele de microinjectare de citoplasmă de tip sălbatic, spre a restabili embrioni mutanți **Toll**, susțin interpretarea că produsul genei **Toll** este (sau produce) un morfogen. Așa cum se constată la **Drosophila**, embrionul normal prezintă aceeași polaritate ca și învelișul oului (chorion). Când mutațiile în oricare din celelalte nouă gene ale dorsalizării sunt restabilite prin microinjectare de citoplasmă normală, embrionul restabilit sau parțial restabilit reține aceeași polaritate ca a corionului, dar, pentru mutațiile **Toll**, polaritatea embrionului salvat este determinată de situsul de injectare a citoplasmei normale. Injecțiile dorsale reversează polaritatea normală a oului, raportată la înveliș. Astfel, spre deosebire de produșii celorlalte nouă gene ale dorsalizării, care doar ajută celulele blastodermului să interpreteze poziția lor în cadrul unui gradient dorsoventral preexistent, produsul genei **Toll** apare a determina însăși polaritatea gradientului. Nu știm dacă această informație pozițională ar putea fi codificată de un gradient al unui morfogen cum ar fi cAMP la **Dictyostelium** (care condiționează aderarea celulelor la celula fondatoare a coloniei, pentru a forma corpul ciupercii), sau de ceva asemănător unui potențial electric, precum forța motrică protonică la bacterii sau propagarea impulsului nervos la eucariotele superioare, prin interacțiuni polare dintre glicoproteine ale suprafeței celulare pe celule adiacente prin structuri citoscheletice mari care străbat întregul embrion, sau de mecanisme pe care nu le putem imagina, deocamdată.

Prin tehnologia ADN recombinant, diferitele gene ale dorsalizării au fost clonate și mutagenizate în vitro. Capacitatea unor asemenea produși genici mutagenizați de a restabili embrionii dorsalizați poate apoi fi testată in vitro, sau reintroducând genele mutagenizate în linia germinală de **Drosophila**, utilizând transformarea mediată de elementul P. Aceste studii pot releva natura fizică a informației poziționale și căile pe care celulele interpretează poziția lor, în cadrul unui gradient de dezvoltare.

4. GENELE HOMEOTICE

În anul 1923 a fost descrisă prima mutantă stranie de drosofilă, denumită **BITHORAX**. Ea prezenta cel de al treilea segment toracic, într-un duplicat al celui de al doilea segment toracic care poartă aripile.

Studiul ulterior al acestor mutante homeotice (care schimbă un segment al corpului cu un altul, normal conformat, dar anormal, absurd localizat, în planul general al acestuia), a demonstrat existența unor similitudini profunde între insecte și vertebrate, în geneza planului corpului lor, în particular în raport cu segmentația și genele care dau fiecărui segment al corpului specific, nativ al localizării sale.

Asemenea mutații homeotice, precum **Bithorax**, determină ca segmentele corpului să se dezvolte ca și când ele ar fi greșit informate asupra localizării lor.

Ele afectează genele numite **homeotice selectoare.** Aceste gene sunt localizate în genom sub forma unor clusteri genici. Cei mai cunoscuți asemenea clusteri genici sunt: complexul ANTENNAPEDIA, desemnat ANT-C și complexul BITHORAX, desemnat BX-C. Compexul ANT-C conține gene care specifică diferențele dintre segmentele anterioare, pe când BX-C este responsabil pentru pattern-ul diferențelor dintre segmentele posterioare. Dacă, de exemplu, are loc deleția întregului cluster BX-C, toate segmentele posterioare până la mijlocul toracelui se dezvoltă ca duplicate ale segmentului mijlociu al toracelui. De fapt, aici ar fi mai corect să se utilizeze termenul de *parasegmente.*

Mutațiile diferiților loci ai complexului BX-C afectează diferite domenii ale corpului și ordinea în care acești loci sunt aranjați în cadrul BX-C corespunde cu ordinea spațială a domeniilor afectate de-a lungul axei corpului, elemente genetice ale lui BX-C sunt afectate secvențial, în acord cu localizarea lor în cromozom. Același lucru este valabil în cazul genelor din compexul ANT-C, de la **Drosophila**. La gândacul **Tribolium**, un singur complex gigantic combină funcțiile celor două complexe întâlnite la **Drosophila**, ANT-C și BX-C, dar corespondența dintre harta genetică și axul corpului este păstrată pe întreaga ei lungime. Complexele de gene selectoare homeotice organizate precum ANT-C și BX-C sunt denumite *complexe HOM*, adică *gene homeotice.*

Complexele HOM au o proprietate care apare a fi crucială pentru funcția lor. Celulele fiecărei regiuni a corpului drosofilei devin marcate în cursul dezvoltării cu un mecanism de înregistrare permanentă a localizării lor, de-a lungul axei cap-coadă. De exemplu, când discurile imaginale sunt transplantate, celulele lor vor persista în diferențiere potrivit localizării lor originale. Totuși, înlăturarea unei gene HOM, prin iradiere X, dintr-o clonă mică de celule, din cadrul unui disc imaginal, poate converti, în dezvoltarea timpurie a animalului respectiv, acel grup de celule, într-un organ caracteristic, corespunzător altei regiuni. Aceasta sugerează că o memorie celulară a localizării sale antero-posterioare în embrion depinde de menținerea extinderii activării complexelor sale HOM. Se presupune că acestea trebuie să devină „înghețate“ la nivelul la care ele au fost orientate de un semnal embrionar tranzient, gradat de-a lungul axei corpului.

S-au identificat paralele surprinzătoare, în acest caz, între variegarea prin efectul de poziție și inactivarea X. Și în cazul variegării prin efectul de poziție, expresibilitatea genică ce se extinde de-a lungul cromozomului în limite variabile, devine „înghețată“ la un moment critic în dezvoltare și apoi este rememorată, ca atare, de către celulă și descendența sa.

Semnificația „extinderii activării“ unui complex HOM a fost clarificată prin clonarea moleculară a lui BX-C. Deși guvernează patternu-ul a cel puțin 9 segmente, acest complex cuprinde numai trei gene codificatoare de proteine, desemnate Ubx, Abd A și Abd B. Experiențele de hibridizare „in situ" arată că aceste gene sunt exprimate serial de-a lungul axei corpului, în acord cu localizările lor cromozomale. Totuși, genele nu sunt exprimate uniform, în toate celulele unui segment dat, în schimb produșii genici sunt utilizați într-un mod subtil și mai variat, spre a da fiecărui segment un caracter unic. Fiecare genă structurală este reglată de un evantai complicat de *enhancers*, adică de amplificatori, și expresia lor este modulată diferit în cadrul fiecărui segment, acolo unde ea este cerută pentru dezvoltarea normală. Cele mai multe mutații homeotice afectează mai curând *enhancers* decât genele structurale și corespondența dintre localizarea cromozomală și domeniul spațial în corp este reală, în mod mult mai complet și detaliat pentru locii reglatori, decât pentru genele structurale înșile. Nu este încă clar, cine inițiază dirijarea complexelor HOM de-a lungul axei corpului (deși se adună progresiv informații în acest sens) și nici nu se știe cum stadiul activării HOM, atins în cursul embriogenezei, este păstrat și moștenit din celula parentală la celula fiică.

Toate genele HOM de drosofilă includ o secvență de 180 perechi de baze, faimosul HOMEOBOX care codifică un HOMEODOMENIU, adică un domeniu înalt conservat al unei proteine ce se leagă la ADN. Evident, toate aceste gene, atât BX-C cât și ANT-C, au derivat prin duplicație și divergență dintr-o genă comună, ce conținea acest homeobox și al cărui produs acționa probabil ca un reglator central al altor gene.

Gene care conțin homeoboxuri au fost descrise și la alte grupuri de viețuitoare, precum mamifere și alte vertebrate. Asemenea gene sunt numite tot gene HOM.

Investigațiile semnalelor intracelulare care generează planul corpului vertebratelor au început în laboratorul lui Spelmann, în anii 1920 — 1930, pentru care a primit premiul Nobel, când printr-o serie de experimente a relevat că o parte specială din stadiul de gastrulă a unui amfibian și anume buza posterioară a blastoporului sau *organizatorul* are proprietăți unice. Acest organizator este o sursă de semnale intracelulare esențiale pentru organizarea axului principal antero-posterior (A-P) al corpului, în timpul embriogenezei, și emite în egală măsură un complex de semnale pentru specificarea capului și cozii. Acest experiment de pionierat a deschis un câmp de investigații ce conduce la identificarea unei ierarhii a interacțiilor inductive dintre celulele care generează planul corpului. Multe detalii ale acestei ierarhii, inclusiv identitățile definitive ale semnalelor din organizatorul Spelmann au rămas neclare.

O descoperire crucială a fost aceea că genele HOX/HOM codifică pentru factori de transcripție care reglează identitatea axului anteroposterior, în embriogeneză, prin activarea sau represarea genelor țintă, situate în aval. Unele dintre aceste ținte codifică pentru molecule implicate în interacțiile celulă-celulă.

Genele Hox sunt organizate într-un cluster homolog, reglat în cursul dezvoltării după un pattern spațio-temporal. Produșii genelor individuale ai acestor clusteri sunt utilizați într-o varietate de căi, spre a specifica pattern-ul a numeroase părți ale corpului, de la cap-la-coadă, nu numai al structurii axiale, dar și al membrelor, pattern-ul cel mai clar fiind la nivelul sistemului nervos central.

S-a realizat și homologia între genele HOM, de la mamifere și genele HOM, de la **Drosophila**. Astfel, gena *Hox-2:1*, de la șoarece, este omologul genei **Scr**, de la drosofilă, fiind mult mai strâns înrudită cu aceasta, decât cu vecinele sale, *Hox-2.2* și *Hox2.6*. Tot astfel, gena *Hox-2.6* este omologul specific al genei **Dfd**, de la drosofilă, ș.a.m.d.

Din nou se poate evidenția corelația simplă între localizarea unei gene în cadrul complexului său de pe cromozom și regiunea unde ea este exprimată în corpul animalului: cu cât gena stă mai departe față de începutul complexului HOM, cu atât mai posterior este domeniul la care expresia sa este realizată.

Este dovedită similitudinea dintre organizarea și pattern-ul de homologie și divergență în compexele HOM de la insectă și utilizarea acestui complex, așa cum se realizează la insecte și probabil și specia umană, spre a specifica diferențele dintre regiunile succesive, de-a lungul axei de la cap-la-coadă a corpului. Homologia genelor HOM de la insecte și vertebrate sugerează, de asemenea, homologia părților corpului definite potrivit genelor HOM, pe care acestea le exprimă.

Dar, construcția corpului la insecte și la vertebrate se bazează pe principii radical diferite. Corpul insectei este construit din segmente — o serie de module care sunt repetate, cu variațiuni de-a lungul axei antero-posterioare. Diferențele în expresia genelor HOM specifică diferențele dintre segmente și granițele domeniilor de expresie a genelor HOM sunt aliniate exact cu granițele segmentale (sau parasegmentale), ca rezultat al reglării expresiei genelor HOM, în embriogeneza timpurie, de către genele care generează segmentele.

Care este corespondentul vertebrat al segmentului insectei? Somitele embrionului uman sau vertebrele la adult nu pot fi omoloage segmentelor insectei, acesta apărând după ce linia vertebratelor s-a separat divergent de aceea a insectelor.

Domeniile de expresie a multor gene HOM de la mamifere, în sistemul nervos central, au granițele lor anterioare în creierul posterior. Examinat într-un cadru adecvat al dezvoltării embrionare, acest creier posterior constă dintr-o serie de 7 sau 8 vezicule numite **rombomere**, delimitate de constricții fine. La păsări, veziculele și constricțiile reflectă o organizare segmentală, regulată, repetitivă, a neuronilor și a țesutului glial, în tubul neural, corelată cu o serie de rădăcini ale nervilor cranieni motori și cu nervii senzitivi cranieni și de aici corelate cu o serie de arcuri branchiale sau fante branhiale pe care aceștia le inervează.

Studii de hibridizare in situ arată că rombomerele sunt, de asemenea, delimitate biochimic: gena **Krox-20** este exprimată în rombomerele (r) 3 și 5, pe când o protooncogenă este exprimată în r5 și r6. În r3 și r5, produsul genei **Krox-20** este responsabil pentru activarea transcripțională a genei **Hoxb-2**.

Prin experimente de recombinare omoloagă, care generează șoareci ce poartă o inserție a lui lac Z în Krox-20, s-a arătat că, deși Krox-20 nu este cerut pentru delimitarea inițială a lui r3 și r5, ea are un rol important în procesul de segmentație.

Implicate în procesul de segmentare sunt, de asemenea, și interacțiile celulare și semnalul de transducere. Prin studii de screening, efectuate de P. Charnay și colaboratorii (1990) asupra expresiei genelor din timpul dezvoltării embrionare pentru tirozinkinază, în pattern-ul restrâns la rombomere, s-a identificat gena **Sek-1**. Aceasta are o expresie înaltă în r3 și r5, ca și **Krox-20**. **Sek-1** codifică un receptor protein kinazic de membrană, ce aparține familiei **Eph**. Aceiași autori au identificat alte trei gene, aparținând aceleiași familii, care se exprimă în aceeași manieră specific rombomerică. Produsul acestor gene constituie alte elemente ale cascadei de reglare ce guvernează pattern-ul de segmentare din creierul posterior.

Experimente de transgeneză au arătat că regiuni similare de control din r3/r5 care leagă specific Krox-20 se găsesc și la pui, în gena paralogă *Hoxa-2* ca și în genele omoloage *Choxa-2* și *Choxb-2*. Astfel, rearanjarea, redundanța și folosirea în comun a reglatorilor de bază sunt realizate diferit în fiecare sistem pentru a îndeplini același scop al interacțiunii genelor din timpul dezvoltării creierului posterior al vertebratelor.

Se poate admite că rombomerele definesc un set de granițe în creierul posterior care au o semnificație majoră în dezvoltarea embrionară. Granițele rombomerelor se corelează precis cu granițele de expresie a genelor HOM, de exemplu, **Hox-2,9** este exprimată în r4, tot astfel cum alte gene ale complexului **Hox-2**, **Hox-2.1**, **Hox-2.6**, **Hox-2.7** și **Hox-2.8** sunt exprimate în domenii, granițele anterioare ale fiecărui domeniu coincizând cu granițele rombomerelor.

Probabil, aceste paralele dintre rombomerele vertebratelor și segmentele insectei sunt doar o coincidență dată de evoluția convergentă, caz în care cele două clase de organisme au evoluat ca sisteme de segmentație independentă și atunci este vorba de o analogie, nu omologie, implicând activarea independentă a compexului HOM la mașinăria de segmentație cu aceeași spațiere de două segmente pe gena HOM. Dar există și alternativa ca aici să fie vorba, într-adevăr, de o omologie reală.

Complexul HOM codifică pentru factori de transcripție cu homedomeniu care sunt ceruți pentru expresia genelor cu specificitate de țesut. **Hoxb 3** se exprimă devreme în embriogeneza mamiferelor, în partea anterioară a neuroectodermului, arcurilor branhiale și derivatelor lor, cuprinzând regiunea primordială tiroidiană și glanda tiroidiană. Transcripția lui **TTF-1** este indusă numai de **Hoxb 3**, alte gene Hox exprimate mai posterior nu au nici un efect. Transactivarea de către

Hoxb 3 este mediată de două situsuri de reglare ce conțin miezul **ATTA**. Analiza *footprinting*-ului DNazei I arată că aceste două situsuri leagă, pe lângă *Hoxb 3* și alți factori nucleari.

E. Boncinelli a studiat expresia a patru gene murine homeobox, înrudite cu două gene ale drosofilei, numite **empty spiracles** (*ems*) și **orthodenticle** (*otd*), exprimate în dezvoltarea capului musculiței. Două dintre acestea, **Emx-1** și **Emx-2**, sunt înrudite cu **ems** și celelalte două, **Otx-1** și **Otx-2**, sunt înrudite cu **otd.** Acestea se exprimă în creierul embrionului de șoarece, între ziua a 10-a și a 16-a. Expresia lui Emx-1 este limitată la regiunile corticale, Otx se exprimă în telencefal, diencefal și mezencefal. În momentul specificării regionale a regiunilor majore ale creierului are loc expresia domeniilor celor patru gene care par a fi regiuni continue, conținute una în cealaltă, în secvența Emx-1 < Emx-2 < Otx-1 < Otx-2, având rol în stabilirea sau semnalarea identității regiunilor variate din creierul embrionar de șoarece, într-un proces progresiv, discret, cu centrul în partea dorsală a telencefalului.

5. MUTAȚIILE HOMEOTICE

Apariția unui embrion dorsalizat poate fi curioasă, dar cea mai stranie anomalie de dezvoltare la drosofilă este reprezentată de **MUTAȚIILE HOMEOTICE**, care transformă o parte a corpului adultului în alta. De exemplu, efectul mutației homeotice dominante, numită *ANTENNAPEDIA* (literar antenă-picior) este transformarea antenei, de la capul insectei, într-un picior perfect conformat, dar absurd localizat. O altă mutație homeotică, mai puțin extremistă, este cunoscută sub numele de *ARISTAPEDIA*, ceea ce presupune transformarea doar a părții distale a antenei (numită aristă) în părțile corespunzătoare ale unui picior (tarsus și extremitatea piciorului-ghiara).

Multe mutații de tip *Antennapedia* apar ca anomalii cromozomale vizibile (translocații, inversii, deleții) la un singur locus. Acum se știe că ADN responsabil pentru fenotipul *Antennapedia* se află în banda 84B, din brațul drept al cromozomului 3. Astfel, existența mutației *Antennapedia* implică produsul unei singure gene sau al unui grup mic de gene care poate lucra ca un simplu mecanism molecular de tip macaz, spre a selecta una sau alta dintre căile dezvoltării, pentru un grup înrudit de celule, din discul imaginal ochi-antene. Existența unor mutații cu penetranță mai slabă precum **Aristapedia** sugerează că alegerea uneia sau a celeilalte căi poate fi realizată independent, în diferitele subgrupe ale acestor celule ale discului imaginal. Astfel, starea diferențiată a unei celule sau grup de celule poate reflecta clar ce combinație de macaz a fost aleasă.

Planul organizării corpului este imens de complicat, chiar și la o creatură mică și comună cum este drosofila, astfel că, **Antennapedia** nu este singurul locus homeotic, de la această insectă. De fapt, s-au descris doi clusteri genici homeotici cunoscuți sub denumirea de *complexul Antennapedia* (ANT-C) și *complexul Bithorax* (BX-C). Genele din *complexul Antennapedia* reglează dezvoltarea capului și a primelor trei segmente toracice (T_1-T_3) ale musculiței, pe când *complexul Bithorax* controlează dezvoltarea a două segmente toracice (T_2 și T_3) și a opt segmente abdominale (A_1-A_8).

Complexul ANT-C conține cel puțin patru gene (*Deformed*, *Sex combs reduced*, *Fushi tarazu*, și *Antennapedia*) abreviate **Dfd**, **Scr**, **Ftz** și **Antp**. *Complexul BX-C* conține trei grupe de complementație (*Ultrabithorax*, *Abdominal-A* și *Abdominal-B*) abreviate **Ubx**, **Abd-A** și **Abd-B**, fiecare conținând mai mult decât o singură genă. Mutațiile apărute în aceste gene homeotice cauzează de obicei defecte atât de severe, încât musculițele mor la sfârșitul embriogenezei. Ocazional, însă, apar mutații neletale care permit supraviețuirea ca adult, dar asemenea musculițe prezintă anomalii vizibile. În grupul de complementație **Ubx** apar trei mutații homeotice neletale, separate, desemnate *abx*, *bx*^{3} și *pbx*, care combinate prin încrucișări genetice au produs musculițe tetraptere la care T_3 este complet transformat în T_2, T_3 purtând în mod obișnuit două aripioare numite balansiere sau haltere și în cazul triplu-mutantei tetraptere, acestea sunt transformate într-o pereche aproape normală de aripi.

Tehnologia ADN recombinat a permis obținerea de clone moleculare pentru toate genele homeotice din complexul **Antennpedia** și **Bithorax.**

6. CONTROLUL GENETIC AL SEGMENTĂRII

Deși gena **ftz** este localizată în complexul **Antennapedia**, între genele homeotice care afectează dezvoltarea capului și a toracelui (thorax), mutațiile genei **ftz** nu sunt strict homeotice. Această genă aparține unui grup fascinant de cel puțin 15 gene responsabile pentru segmentarea corectă a embrionului. Aceste gene ale segmentării se încadrează în trei clase, **ftz** aparținând clasei pereche conducătoare. Într-un homozigot **ftz**, jumătatea posterioară a segmentelor (T_2, A_1, A_3, A_5 și A_7) și jumătatea anterioară a segmentelor (T_1, T_3, A_2, A_4, A_6 și A_8) este deletată (absentă). Segmentele jumătăți rămase apar a fi fuzionate, astfel că embrionul rezultat are jumătate din numărul normal de segmente. De altfel, în limba japoneză, **fushi tarazu** înseamnă „nu sunt suficiente segmente“.

Comportamentul celor mai multe mutante de segmentație a constituit inițial un fenomen foarte ciudat, deoarece defectele în mod frecvent nu afectau un singur segment sau grup de segmente, ci mai curând jumătatea unui segment și jumătatea adiacentă a segmentului următor. Acum a devenit clar că **unitățile de bază în organizarea corpului insectei**, atât în stadiul larvar, cât și în stadiul de adult pot să nu fie segmente vizibile morfologic, definite vizual prin constricții ale corpului, ci, mai curând, **parasegmente** care se întind din mijlocul unui segment morfologic, în mijlocul următorului segment, constricția căzând în cadrul fiecărui parasegment.

Observarea faptului că foarte puține mutații subtile în genele reglatoare sunt suficiente să transforme un segment al corpului musculiței în alt segment sau să reducă numărul total de segmente ale corpului larvei, are mari implicații evolutive. Insectele superioare au relativ puține segmente ale corpului și 2 sau 4 aripi, dar sunt recunoscute după recordurile fosile că au evoluat din anelide, precum râma, cu multe segmente identice ale corpului. Astfel, evoluția insectelor apare a reflecta mutațiile care au apărut spontan, asemănătoare cu cele identificate experimental, de către geneticieni, în laborator. Capacitatea unei singure mutații de a schimba dramatic, drastic, planul de organizare al corpului unui organism ne ajută să înțelegem cum acumularea multor mutații independente a condus, în decursul unei evoluții îndelungate, la incredibila varietate actuală a formelor de viață.

Multe dintre genele homeotice de la drosofilă sunt enorm de lungi, comparativ cu alte gene. Un ARNm precursor embrionic, codificat de complexul **Antennapedia**, este aproape în întregime alcătuit din introni, astfel că ARNm derivat prin clivare și sudare din transcriptul primar de 100 kilobaze are numai câteva kilobaze. În mod similar, transcriptul primar al regiunii **Ultrabithorax**, din complexul **Bithorax**, este de circa 75 de kilobaze, deși ARNm matur derivat din el este de dimensiune obișnuită, de câteva kilobaze.

De ce unele transcripte homeotice sunt așa de lungi? O idee este că, atât procariotele cât și eucariotele pot utiliza unități transcripționale lungi, spre a controla genele, când acestea acționează. Această posibilitate este în general valabilă pentru eucariote, la care ARNm nu poate fi complet detașat din transcriptul primar, până ce nu a fost transcris exonul cel mai din aval.

O altă posibilitate este aceea că pot fi desprinse dintr-un singur transcript primar, multiple specii de ARNm, într-o manieră reglată în cursul dezvoltării, de exemplu, un ARNm embrionic **Antennapedia** include cel puțin patru exoni, pe când o specie de ARNm sintetizat ulterior, în cursul stadiului de pupă, include, de asemenea, exoni embrionari, împreună cu un exon adițional, specific — pupal. Deoarece mulți exoni apar a codifica domenii proteinice, cu funcții structurale sau enzimatice distincte, modele alternative de clivare cu cele întâlnite în complexele

Antennpedia și **Bithorax** pot reprezenta un mecanism pentru organisme, spre a adapta o structură proteinică de bază (codificată de exonii miezului) la scopuri diferite, dar înrudite. Prin adăugarea sau scoaterea de domenii proteinice funcționale, codificate de exoni opționali în dezvoltare, proprietățile strucurale și enzimatice ale produsului genic homeotic pot fi în mod subtil modificate și abilitatea proteinei de a interacționa cu alte componente celulare poate fi schimbată, pe măsură ce dezvoltarea se desfășoară.

Cel mai suprinzător aspect desprins din analiza secvenței genelor ce controlează pattern-ul embriogenezei la **Drosophila** este existența unei secvențe scurte de 180 perechi de baze numită HOMEOBOX care este întâlnită în cadrul exonului 3' al multor gene homeotice și de segmentare, incluzând regiunile **Ubx, Abd-A, Abd-B**, din complexul **Bithorax** și **Dfd, Dcr, ftz** și **Antp**, din complexul **Antennapedia.**

Homeobox codifică o secvență înalt conservată de 60 de aminoacizi, reprezentând domeniul homeo al proteinei mai mari, domeniu care leagă probabil un situs de pe ADN al genei sale țintă, reglând astfel transcrierea, cu sinteza unui anumit ARN. Legarea la ADN s-a dovedit prin utilizarea anticorpilor care marchează invariabil nucleul. Homeobox-uri s-au găsit la toate metazoarele, incluzând omul. Genele homeobox joacă un rol central în reglarea embriogenezei, având o largă răspândire filogenetică, și expresia lor prezintă specificitate de țesut și stadiu al dezvoltării.

Genele homeobox joacă un rol general și semnificativ în dezvoltarea animală, fiind implicate în aspecte majore ale embriogenezei.

Când secvențele ADN homeobox sunt traduse într-o fază corectă de citire, toate secvențele minore divergente au la bază substituții conservative ale unui aminoacid cu un altul înrudit, astfel că nu vor fi afectate activitatea enzimatică și proprietățile structurale ale produsului genic. Dar, și mai interesantă este constatarea recentă că, atunci când homeoboxul **Antennapedia** este utilizat ca probă radioactivă, spre a identifica secvențe ADN comparabile la alte eucariote, precum broasca cu gheare africană **Xenopus**, șoarece și om, s-a constatat că la toate aceste specii apar secvențe înrudite multiple. De fapt, unul dintre homeoboxurile de **Xenpopus** este atât de similar homeobox-urilor **Antennapedia**, de la **Drosophila**, că diferența este de numai un aminoacid din 60, în decurs de milioane de ani de evoluție separată a celor două specii. Aceasta sugerează posibilitatea ca unele din aceleași mecanisme care joacă un rol în morfogeneză la drosofilă, să fie active, adică funcționale, și la vertebrate și că produșii genici (sau părți ale lor) au fost supuși la presiunile selective cele mai extreme imaginabile, în cursul evoluției, nemodificându-se milioane de ani. Există chiar indicii preliminare potrivit cărora transcriptele MATa1 și MATa2, de la drojdia

Saccharomyces cerevisiae, prezintă o oarecare homologie cu o parte a homeobox-urilor de la drosofilă și vertebrate. Deoarece locusul MAT este un determinator de pendulare binară (**binary switch determining**) a condiției drojdiei de a fi de tip de încrucișare **a** sau α, această constatare alimentează speculația că genele homeotice pot fi activate sau inactivate în grupe de celule, în cadrul unui cod funcțional capabil de a specifica destinul dezvoltării părților majore ale corpului.

Gena homeotică **Antennapedia** afectează inițierea acțiunii de determinare ca o parte din, sau chiar tot discul imaginal, să devină o parte sau întreaga structură particulară de pe suprafața musculiței (cuticula). O alternativă ar fi aceea de a menține această stare de determinare în cursul celor trei stadii larvare. Produsul de transcriere al unei gene homeotice particulare va fi găsit în anumite regiuni ale embrionului, dar nu și în altele, fapt dovedit prin tehnica identificării sale cu fragmente marcate de ADN ce cuprind gena homeotică, prin tehnica de hibridare *in situ*, utilizată pentru cartarea localizării genelor în cromozomi, proba marcată radioactiv reasociindu-se cu ARNm monocatenar în secțiuni fine de țesut, nu cu ADN denaturat din cromozomi, aflați în preparate citologice. Fragmentul de ADN din gena **Dfd** a complexului **Antennapedia** detectează o concentrație de transcripte, exact după formarea blastodermului celular. ARNm este distribuit ca o centură la 1/3 distanță înapoia capătului anterior al embrionului, într-o regiune cunoscută a forma capătul posterior al capului și primele segmente toracice ale musculiței. Aceasta este exact regiunea identificată de geneticieni ca țintă afectată de mutații în gena **Dfd**.

Diferențierea celulară se realizează și prin recunoașterea celulară în cadrul aceluiași compartiment, prin intermediul glicoproteinelor de suprafață celulară specifice fiecărui compartiment, așa cum se întâmplă și în cazul sistemului imunitar.

Nu este cunoscută natura mecanismelor de pendulare moleculară de la un tip de celulă la altul, care asigură determinarea, transdeterminarea și diferențierea și care face ca celulele din cadrul unei clone celulare să-și „amintească“ starea lor de determinare de o manieră ereditară. Memoria ar putea corespunde unei modificări în ADN, precum este o inversie cromozomală (ca și în cazul fazei de variație a tipului flagelar de la **Salmonella**), conversie genică direcționată (ca în schimbarea tipului de împerechere de la drojdia de bere), sau metilarea/demetilarea unor secvențe specifice de ADN. O altă posibilitate este ca memoria să reflecte o schimbare ereditară în proteinele cromozomale care împachetează ADN și reglează expresia. Nu este exclus ca memoria să fie reținută în nucleoplasmă sau citoplasmă prin circuite metabolice *feedback* sau structuri citoscheletice autoreplicative, fără înregistrări cromozomale.

Modelul de formare a embrionului de drosofilă este determinat de o ierarhie de gene reglatoare. Genele materne exprimate în celule hrănitoare în cursul ovogenezei sunt responsabile pentru stabilirea gradienților de informație pozițională, de-a lungul axelor majore de dezvoltare a oului, așa cum sunt cele 10 sau mai multe gene ale dorsalizării. Genele exprimate în embrionul timpuriu determină plierea inițială a blastodermului celular. Sunt apreciate a fi 15 sau mai multe asemenea gene ale „segmentării". Și genele exprimate încă și mai târziu în embriogeneză pot transforma parțial sau complet o parte a corpului adultului în alta, prin transdeterminarea destinului unei policlone celulare (celule multiple din cadrul unui disc imaginal pot suferi transdeterminare simultană și apoi proliferează), astfel că țesutul organului rezultat este o policlonă — descendentele a mai multor celule inițiale diferite din cadrul unui disc imaginal.

7. CONTROLUL POZITIV AL FUNCȚIEI GENICE PRIN STEROIZI

Ecdisteronul sau ecdizonul este un hormon de creștere care este responsabil de trecerea cu succes a insectei de la stadiul de larvă la pupă. În perioada larvară timpurie, pattern-ul de pufarea a cromozomilor politeni de drosofilă este stabil. Dar, în momentul în care ecdisteronul este eliberat în hemolimfa larvei, pufele preexistente regresează, în schimb apar peste 100 de pufe noi ce se dezvoltă rapid în intervalul trecerii de la larvă la pupă. Fiecare bandă pufează într-un anumit moment și rămâne activă pentru anumit interval binedefinit. Primele asemenea pufe (cele „timpurii") încep să apară la 5 minute de la eliberarea hormonului, deoarece aspectul lor nu este afectat de inhibitori ai sintezei de proteine. Dimpotrivă, pufele „târzii", care apar la câteva ore după adăugarea ecdisteronului, nu mai apar dacă sinteza proteinică este blocată. Se presupune că produșii proteinici codificați de gene de la nivelul pufelor timpurii produc formarea de pufe târzii. În cazul apariției pufelor timpurii, ecdisteronul se leagă direct la cromozomi în situsul în care are loc pufarea și deci transcrierea genică. Experimental, s-a dovedit că ecdisteronul poate fi crosslincat fotochimic la situsurile pufelor timpurii. Astfel, ecdisteronul poate funcționa la insecte, așa cum fac alți steroizi, la celulele animalelor superioare. Hormonul se leagă mai întâi la o proteină receptoare specifică și apoi acest complex hormon-receptor se leagă direct la ADN, la nivelul unor secvențe specifice, unde modulează transcrierea. Deși steroizii funcționează de obicei ca activatori pozitivi al transcrierii, nu întotdeauna se înregistrează această situație. Alături de inducerea expansiunii unor pufe timpurii, ecdisteronul cauzează, de asemenea, regresia (recondensarea) unui grup diferit de pufe preexistente. Mai mult, ecdisteronul apare a se lega direct la aceste pufe de regresie, de aceeași manieră în care se leagă la pufele în expansiune inductibile cu hormon. Aceste observații interesante sugerează că, cel puțin la insecte, și probabil și la eucariotele superioare, hormonii steroizi pot funcționa, de asemenea, ca reglatori negativi ai transcrierii. Aceasta nu trebuie să ne surprindă. La bacterii, represorii lucrează prin blocarea fizică a situsurilor din ADN, acolo unde trebuie să se lege ARN polimeraza. Astfel, în principiu, orice proteină care funcționează ca un activator pozitiv al transcrierii, prin recunoașterea unei secvențe specifice din ADN ce reprezintă o genă, poate funcționa, de asemenea, ca un represor al altei gene. Pentru ca proteina activatoare să funcționeze ca un represor, situsul de legare a proteinei la cea de a doua genă trebuie numai să fie localizat într-o regiune care este esențială pentru transcriere. Astfel, poziția unui situs de legare a proteinei raportată la promotor poate determina dacă legarea unei proteine particulare modulează pozitiv sau negativ transcrierea genică.

Nematodul **Caenorhabditis elegans** este un vierme foarte mic, care este foarte mult utilizat în cercetări de biologie moleculară a dezvoltării. El are circa 1 mm lungime și un plan al corpului foarte simplu. Poate fi crescut în cutii Petri însămânțate cu bacterii — hrana sa favorită.

Acest vierme se reproduce cu un timp de generație de trei zile, de la concepție la maturitate. Există două sexe (hermafrodiți și masculi) și un număr mare de descendenți (33 per părinte), astfel că se pot face analize genetice relevante. Lucrul cel mai important, viermele este transparent în toate stadiile ciclului de viață de la ou la adult, astfel că anatomia celulară a viermelui în dezvoltare poate fi examinată și înregistrată cu precizie absolută în animalul viu, utilizând un microscop optic, echipat cu optica de interferență Nomarski — contrast de fază. Optica de interferență prezintă diferențe în indicele de refracție între diferite organite celulare. Prin urmărirea mișcărilor și diviziunilor nucleilor celulari, înalt refractabili, începând imediat după fecundare, a fost posibil să fie reconstruită întreaga istorie anatomică a fiecărei celule, pe măsură ce oul fecundat se dezvoltă într-un adult multicelular. S-a constatat că fiecare celulă a individului adult derivă din zigot, printr-o serie invariantă de diviziuni celulare, migrații celulare și morți celulare, ocazional programate, rezultând linii celulare specifice, invariante. În al doilea rând, ca o consecință directă a liniilor celulare invariante, luate ca entități individuale, acestea reprezintă copii invariante anatomic, adică „trase la indigo". Adultul matur hermafrodit este întotdeauna alcătuit din 945 celule (numărul de nuclei este ceva mai mare, deoarece unele țesuturi, precum intestinul, sunt parțial sinciții). Dintre acestea, 302 sunt întotdeauna neuroni, care derivă din 407 celule precusoare neurale, dintre care 105 suferă întotdeuna o moarte celulară programată. Din cei 302 neuroni supraviețuitori, 8 sunt totdeuna *dopaminergici* (răspund la neurotransmițătorul dopamina) și 2 sunt *serotoninergici* (răspund la serotonină). Celelalte 643 celule nonneuronale, la adultul hermafrodit, pot fi descrise cu aceeși precizie ca acelea din sistemul nervos. Nici un alt organism eucariot nu îl poate rivaliza pe acest vierme nematod, din punct de vedere al posibilităților de descriere a detaliilor anatomice.

Cele 302 elemente neurale circuitare ale viermelui adult pot fi atât de simple (și, este sigur, tot atât de reproductibile) ca circuitele imprimate într-un calculator portabil, de producție în masă. Dimensiunea atât de mică și simplicitatea acestui vierme permit avansarea rapidă a analizei moleculare a dezvoltării embrionare la eucariote. Cunoscând cum un vierme își coordonează mișcările dorite ale musculaturii corpului său, sau cum evenimentele neurale coordonează împerecherea unui mascul cu un individ hermafrodit (la această specie nu există femele), vom putea avea o imagine reală a funcției neuronale și, cu puțin noroc, asemenea date ar putea să constituie fundamentul înțelegerii modelului rețelei incomparabil mai compexe din creierul nostru, în care miliarde de celule sunt interconectate într-o manieră variabilă și care rămâne deocamdată un mister.

La **C. elegans** pot fi foarte ușor identificate mutante cu anomalii comportamentale evidente în mișcare, termotactism, chemotactism, evitarea presiunilor osmotice înalte, sensibilitatea la atingere, depunerea ouălelor, sinteza și degradarea neurotransmițătorilor etc. De exemplu, mutantele **unc** realizează o mișcare necoordonată sau devin imobile, având defecte fie în nervii musculaturii sau în joncțiunile neuromusculare, implicate în mișcările fine și eficiente de glisare (alunecare). Caracterizarea mutantelor **unc** a dus la identificarea multor gene, inclusiv a celor pentru actină și miozină.

8. PROTEINELE PAX — CHEIA FACTORILOR DE TRANSCRIPȚIE ÎN EMBRIOGENEZĂ

Toți cei 9 membrii ai genelor homeobox pereche mamaliene (**Pax-1** — **Pax-9**) conțin un motiv de legare la ADN, numit *homeobox pereche*. În plus, genele **Pax-3, Pax-4, Pax-6** și **Pax-7** au o a doua secvență de legare la ADN, numit *homeoboxul tip pereche*. Toate genele **Pax**, cu excepția genelor **Pax-1** și **Pax-9**, prezintă un pattern de expresie spațio-temporal distinct în dezvoltarea sistemului nervos, cu rol în specificarea regională a dezvoltării creierului și măduvei spinării. Genele homeobox pereche au un rol esențial în dezvoltare, și codifică proteine cu secvență specifică de legare la ADN care reglează expresia genică. Importanța genelor **Pax** în dezvoltare este ilustrată de deteriorarea lui **Pax-3** și **Pax-6**, în șoarecii mutanți (ochi mici și pătați) și în bolile umane (sindromul Waardenburg și Aniridia) conducând la anomalii în derivatele crestei neurale, țesuturile neuroectodermice și miotonice.

Pax-3 conține un homeodomeniu pereche și un homeodomeniu tip pereche separate de 53 aminoacizi. Legarea eficientă a lui **Pax-3** la domeniile homeo- și pereche are loc la secvențele ce conțin ambele motive de recunoaștere, GTTCC și ATTA. Prin inserția de nucleotide în interiorul secvenței de recunoaștere a celor două domenii s-a observat că ele sunt foarte flexibile în recunoașterea celor două motive și induc o schimbare conformațională în ADN. Proteinele **Pax-3** truncate, ce conțin doar domeniile pereche, sunt capabile de legare la secvența GTTCC, în timp ce proteinele întregi nu sunt capabile. De asemenea, homeodomeniul tip pereche nu se poate lega la secvența ATTA, dar contribuie la legarea proteinei **Pax-3** integrale. **Pax-3** se leagă la ADN ca proteină homeodimerică. Mutațiile în **Pax-3** reduc capacitatea de legare la ADN. Amplificarea randomică a secvențelor ADN de legare pentru proteinele Pax a arătat că unele secvențe sunt comune, în timp ce altele sunt situsuri specifice de recunoaștere pentru proteinele Pax.

9. SPECIFICITATEA TRANSCRIPȚIONALĂ A ARN POLIMERAZEI

ARN polimerazele I și II transcriu molecule specializate de ARN, în timp ce ARN polimeraza III transcrie gene ce codifică pentru o varietate de molecule ARNsn, înalt conservate, care îndeplinesc diverse funcții nucleare și citoplasmatice. Genele pentru ARNt și 5S sunt transcrise de ARN polimeraza III și sunt guvernate de promotori situați exclusiv în regiunea codificatoare. Cazul genei U6 ARNsn reprezintă o excepție de la regulă, având promotori externi regiunii codificatoare. Elementele sale promotoare sunt localizate exclusiv în aval față de situsul start de transcripție și constă în motivul TATA și o secvență element proximală (PSE). Specificitatea polimerazei III este guvernată de motivul TATA și, de asemenea, de spațiul strict dintre promotorii TATA și PSE și situsul start de transcripție. TBP — proteina de legare la TATA, a fost descrisă ca aparținând complexului transcripțional U6 și se leagă la cutia TATA. A. Krol, în colaborare cu L. Tora, a arătat că regiunea domeniului N-terminal a lui TBP este implicată în transcripția in vitro a genei U6, dar nu și în cea a genei ARNt care conține TBP în complexul de transcripție, și nu posedă cutia TATA. Și mai neașteptat pentru o genă transcrisă de ARN polimeraza III este faptul că transcripția de la promotorul U6 este stimulată in vivo de un element activator din aval care, in vitro, leagă specific Oct+1 și Sp1.

Transcripția de către ARN polimeraza III cere participarea câtorva factori de transcripție generali. Formarea complexului de transcripție are trei etape:

– legarea factorului TF III C la elementele promotoare intragenice, blocurile A și B;

– TF III C recrutează TF III B care, singur, nu se leagă la ARN;

– Complexul TF III B — ADN recrutează și direcționează inițierea corectă a ARN polimerazei III.

S-a pus întrebarea dacă rolul factorilor de transcripție este acela de a recruta ARN polimeraza. Pentru aceasta s-a construit un sistem de transcripție ARN poliemraza III himeric. Promotorul deficient al genei U6 ARN care poartă situsul de legare pentru GAL4 (UASG) poate fi reactivat prin fuzionarea domeniului de legare la ADN a lui GAL4 cu subunități ale lui TF III C și TF III B. În unele subunități ale lui TF III C activează transcripția ce începe de la UASG localizat în diverse poziții, în aval sau în interiorul genei. Toate funcțiile domeniului de legare la blocul B al lui TF III C pot fi înlocuite de domeniul GAL4 (1-147). GAL4 (1-147) — TF III B 70 fuzionat este asemănător unui activator transcripțional. Nici una dintre cele 10 subunități GAL4 (1-147) — polimerază fuzionată nu este capabilă să inducă transcripția, sugerând că recrutarea ARN polimerazei la promotor nu este suficientă pentru a iniția transcripția.

S-a descoperit un al tip de gene de genul care deviază de la schema clasică a promotorului pentru polimeraza III — gena pentru solenocisteină ARNt^{Sec}. Transcripția sa in vivo este dependentă de trei elemente promotoare: cutia TATA, PSE, interschimbabili funcțional, și blocul extern B, ca în genele clasice ARNt. A. Krol în colaborare cu K. Seifart și A. Sentenac, a arătat că TBP face parte din complexul transcripțional și se leagă la cutia TATA. Acest fapt este în contrast remarcabil cu genele clasice ARNt, dar identic cu situația pentru U6. Transcripția de la promotorul ARNt este activată in vivo de un element activator din aval care leagă o proteină a cărei analiză funcțională este în curs de cercetare.

Exemplul cel mai concludent că ARN polimerazale II și III sunt înrudite este promotorul genelor ARNsn. Genele ARNsn din plantele dicotiledonate (**Arabidopsis**, tutun) sunt transcrise de ARN polimerazele II și III. Aceste gene au promotori identici, alcătuiți din TATA (-30) și USE (localizat la 3-4 tururi helix, în aval față de TATA). Spațierea dintre elemente determină specificitatea ARN polimerazei față de gene. De notat că, la plante, gena U3 ARN este transcrisă de către ARN polimeraza III și nu de către ARN polimeraza II, ca la celelalte eucariote. Este posibil ca această conversie a specificității promotorului să fi avut loc în timpul evoluției plantelor și a implicat o schimbare în spațierea TATA-USE.

Transcripția genei U ARNsn la monocotiledonate (porumb, grâu) cere, pe lângă TATA și USE și alt(e) element(e) situate în aval. Aceste elemente sunt funcțional interschimbabile în genele pentru ARN polimeraza II și ARN polimeraza III și indică faptul că aceste clase de promotori au coevoluat.

Plantele, ca de exemplu **Arabidopsis** și porumbul, spre deosebire de alte organisme, au două gene ce codifică pentru două isoforme TBP. Pentru că nu există nici o plantă care oferă un sistem de transcripție in vitro, s-au făcut experimente cu TBP mutante (cu mutațiile a trei aminoacizi în a doua secvență direct repetată a TBP) care se leagă specific de cutiile TATA cu mutația TATAAA ♦ TGTAAA. S-a găsit că isoformele TBP din **Arabidopsis** sau mutantele TBP, care aparțin omului și drojdiilor, exprimate în plante, salvează transcripția de către ARN polimerazele II și III a genei U ARNsn și, de asemenea, a ARNm care poartă mutația TGTAAA. Spre deosebire de drojdii, în celulele plantelor, mutantele TBP sunt capabile să salveze transcripția genelor ce au și alte mutații în cutia TATA decât TGTAAA. Această salvare are specificitate de genă. De asemenea, multe mutații în cutia TATA salvate de TBP cu mutație în a doua secvență direct repetată sunt salvate și de TBP cu mutație în prima secvență direct repetată.

Prin studierea genelor U6 și ARNt^{Sec} s-a concluzionat:

– existența a 3 clase de promotori pentru ARN polimeraza III: doar intern (5S ARN, ARNt), doar extern (U6) și mixt (ARNt^{Sec}). Transcripția ultimelor două arată stimularea de către activatorii din aval, o funcție nesemnalată până acum în transcripția de către ARN polimeraza III.

– specificitatea ARN polimerazei III pentru genele ce conțin TATA nu este guvernată numai de identitatea elementelor promotoare ci și de arhitectura complexului de transcripție format, datorat spațierii dintre aceste elemente de-a lungul ADN-ului.

– datorită faptului că unii factori cu care interacționează ARN polimeraza II sunt, de asemenea, utilizați de către ARN polimeraza III, înrudirea dintre cele două polimeraze este mai strânsă decât aceea dintre ARN polimeraza I și ARN polimeraza II.

10. REGLAREA GENELOR HOX

Genele Hox sunt organizate într-un cluster homolog reglat în cursul dezvoltării, după un pattern spațio-temporal, în mod particular în sistemul nervos central (SNC), scheletul axial și membre. Genele Hox sunt reglate de retinoizi, derivați naturali ai vitaminei A. Ele au un efect pleiotropic în diferențierea celulară și dezvoltare. Sunt trei astfel de tipuri de molecule:

– toți acizii trans retinoici (T-RA);

– acizii 9-cis retinoici (C-RA);

– acizii 3,4-didehidroretinoici (T-ddRA) — reprezintă sau mimează acțiunea morfogenilor naturali (molecule implicate în specificarea primară și pattern-ul dezvoltării).

Semnalele retinoizilor sunt mediate de două familii de receptori nucleari: receptorul pentru AR (RAR) și receptorul pentru XR (RXR) acționează ca factori de transcripție induși de liganzi asupra elementelor de răspuns cis-activatoare RARE și RXRE. Retinoizii sunt prezenți în concentrație activă în structurile embrionice, având un rol dovedit în formarea pattern-ului ca: zone de activitate polară (ZPA); nodulul Hensen; placa bazală a tubului neural. Administrarea locală sau sistemică de T-RA în exces pentru dezvoltarea embrionului are efecte profunde asupra pattern-ului axial și specificării de identități regionale în CNS, schelet axial și membre. Acestea sunt acompaniate invariabil de schimbarea pattern-ului în domeniile de expresie a genelor HOX, sugerând rolul specific al produșilor genelor HOX ca transductori moleculari ai semnalelor morfogenilor date de retinoizi.

Analiza populațiilor neuronale specifice și proiecțiile lor în dezvoltarea creierului posterior la pui a relevat o organizare metamerică în care perechile de rombomere cooperează pentru a genera secvența repetată a nervilor cranieni branhiomotori. În creierul posterior are loc expresia în domenii restrânse la segmente a unui număr de gene ce codifică pentru factori de transcripție, incluzând gene zinc finger **Krox-20** și multe gene HOX, cu homeobox. Pattern-ul de expresie limitat apare înainte de segmentarea morfologică, sugerând că unii din acești factori de transcripție au un rol timpuriu în transcripția și specificarea segmentelor rombomerice. **Krox-20** se exprimă specific în rombomerele (r) 3 și 5, în aceste rombomere produsul lor este responsabil pentru activarea transcripțională a genei **hoxb-2**.

11. FACTORI DE TRANSCRIPȚIE SPECIFICI TIROIDIENI

TTF-1 a fost prima dată identificat la șobolan, ca un factor de transcripție cu homeobox, specific tiroidian. Inițierea și menținerea diferențierii tiroidiene, prin faptul că unele gene sunt transcrise la acest nivel, dar nu și în alte țesuturi, reprezintă o problemă interesantă a biologiei moleculare. Celulele tiroidiene oferă un model excelent pentru studiul acestei probleme, ele fiind celule specializate care exprimă funcții diferențiate pentru sinteza și secreția hormonilor tiroidieni. Tioperoxidaza (TPO) este principala enzimă implicată în biosinteza hormonilor tiroidieni, prin iodarea și cuplarea resturilor de tirozină cu tiroglobulină (Tg). Expresia genelor **TPO** și **Tg** este limitată la celulele tiroidiene. Aceste gene se află sub controlul hormonului pituitar TSH și insulinei/IGF-1, prin intermediul a trei factori: TTF-1, Pax-8 și TTF-2. TTF-1 se leagă la promotorul ambelor gene și este nevoie de cel puțin două situsuri ADN de legare. Mutația situsului de legare pentru TTF-1 duce la pierderea activității promotorului. Recent, elementele enhancer au fost identificate în aval de gena Tg, de la vacă și de la om și conțin, de asemenea, situsuri multiple de legare pentru TTF-1. Efectul lui TSH este mai rapid decât cel al insulinei și este mimat de cAMP.

Studiile de transactivare, făcute pe celulele non-tiroidiene, demonstrează că expresia lui TTF-1 datorată unui promotor viral, este capabilă să activeze transcripția promotorului Tg și TPO. Experimente de hibridizare in situ, efectuate în diferite stadii ale dezvoltării embrionului de șoarece, cu probe derivate din secvențele genice de TTF-1, Tg și TPO au demonstrat că expresia lui TTF-1 este corelată cu apariția de markeri specifici, în timpul organogenezei tiroidiene. TTF-1 se exprimă la 10,5 zile, în tiroida primordială, iar markeri specifici ai tiroidei Tg și TPO apar cu o întârziere de cinci zile. La șobolani, TTF este exprimat nu numai în tiroidă, ci și în plămâni și în arii restrânse din creier.

Pentru explicarea reglării TTF-1, în timpul dezvoltării, în țesuturi diferite decât cele tiroidiene, s-au investigat mecanisme care interferă cu activarea transcrierii de către TTF-1.

În celulele tiroidiene transformate de oncogena **Ha-ras**, nivelul aproape normal de TTF-1 este pe deplin activ în legarea de ADN. Aceasta sugerează că oncogena **Ha-ras** interferă cu activarea transcrierii de către TTF-1 și nu cu proprietatea acestuia de legare la ADN.

Discrepanța dintre efectul mutațiilor la situsul de reglare pentru TTF-1/Pax-8 și nedetectarea alterărilor calitative sau cantitative în această proteină poate fi explicată prin modificarea posttranslațională a ambelor proteine care le afectează activitatea. Această modificare se află sub controlul lui TSH și insulin/ IGF-1. TTF-1 este o fosfoproteină și este fosforilată numai în resturile serină. Un mecanism posibil al reglării transcrierii de către hormonii peptidici și factorii de creștere constă în modularea stării de fosforilare a factorilor transactivatori. Astfel, TSH și insulin/IGF-1 reglează activitatea transactivatoare a lui TTF-1 la ADN prin calea PKA și PKC și nu prin legarea lui.

12. FUNCȚIILE MEDIATE DE CITOKINE ALE PROTEINELOR ÎNRUDITE CU NFkB

Factorii de transcripție NFkB induc transcripția a numeroase gene virale implicate în răspunsul celular la stres și inflamație. Forma dimerică de legare la ADN a lui NFkB este reținută în majoritatea tipurilor de celule ca o formă citoplasmatică inactivă de către subunitatea inhibitoare IkB. Stimularea celulei cu agenți patogeni, de exemplu lipopolizaharide bacteriene, citokine inflamatorii (IL1, TNFα), mitogeni (PMA și PHA) sau infecții virale, conduce la degradarea proteolitică tranzitorie a lui IkB. Dimerul de legare la ADN, astfel eliberat, este transportat în nucleu, la domeniul ADN de legare, și induce transcripția genei.

Mecanismul prin care diferiții agenți activează NFkB este puțin înțeles, dar se cunoaște că sunt implicate etape de degradare a moleculei IkB și fosforilare.

Fiziologic, factorii din familia Rel sunt prezenți constitutiv în nucleul limfocitelor B diferențiate, iar în limfocitele T translocarea nucleară este indusă în timpul activării. Funcția lor este deosebit de importantă pentru expresia genelor ce codifică pentru imunoglobuline, receptorii celulelor T, receptorii pentru IL2, H2 și multe alte gene și de asemenea, pentru activitatea enhancer-ilor virusurilor ca HIV-1 și SV40. Complexitatea structurală a acestei proteine de legare la ADN este nedeslușită. Ea are abilitatea de a forma complexe homo- sau heterodimerice, capabile de legare la aceleași secvențe ADN sau la secvențe similare. S-a descoperit că unul dintre aceste complexe heterodimer, prezente în citoplasma celulelor HeLa, este compus din Rel A (p65) și cRel. Aceasta s-a arătat prin studii de purificare, co-translație in vitro și co-expresie in vivo, în celulele COS7 (Hansen și colab., 1992). Aceste studii au relevat că în citoplasma celulelor HeLa ca și a altor celule, Rel A formează compexe fie cu cRel, fie cu NFkB 1(p50), deși se află într-o stare inhibată.

IkB inhibă complexul heterodimeric prin legare fie la RelA, fie la cRel. Cele două coplexe au funcții diferite: cRel — RelA și NFkB — RelA sunt activatori puternici; folosind diferite raporturi ale celor două subunități, s-au obținut efecte diferite.

Când este în exces, c-Rel crește continuu activarea transcripției de către RelA, în timp ce excesul subunităților NFkB1 duce la inhibarea transcripției. Cele 2 complexe sunt diferit reglate de către PMA, pe o cale specifică de țesut.

Modularea expresiei genelor celulare și virale dependentă de NFkB depinde de secvența ADN a EH genelor, de natura complexului de legare la ADN, de balanța fină a subunităților care compun acest complex. Analiza interferenței metilării și mutațiilor a arătat că nucleotidele de flancare a motivului kB este hotărâtor în recunoașterea celor două complexe.

În scopul investigării fenomenului de activare a lui NFkB din timpul dezvoltării limfocitelor T umane, s-a studiat activarea acestui factor în timocitele umane și s-a comparat cu activarea celulelor T mature. S-au observat două diferențe: o fracție a sa se găsește constitutiv în nucleul timocitelor (nu este clar dacă NFkB activat este prezent într-o subpopulație specifică a timocitelor, corespunzătoare unui stadiu specific al dezvoltării timocitelor, sau dacă este prezent la un nivel scăzut în nucleul timocitelor); activarea lui NFkB în timocite de către esterul forbol a lui PMA nu cere un influx de Ca^{2+}, în calitate de coactivator.

13. ROLUL RECEPTORILOR NUCLEARI ÎN DIFERENȚIEREA MIELOIDĂ

Leucemia acută promielocitară (APL) — **Acute Promyelocitic Leukemia** — are loc prin translocația t(15;17). APL reprezintă expansiunea precursorilor hematopoietici opriți în stadiul de promielocite. Translocația este balansată și conduce la formarea a două gene de fuziune: PML/RARα și RARα/PML. Ambele sunt exprimate în APL. Gena PML/RARα codifică pentru două proteine anormale: proteina de fuziune PML/RARα și proteina anormală PML, gena RARα/PML codifică pentru proteina de fuziune RARα/PML.

Locusul PML se întinde pe o secvență de 35 kb și conține 9 exoni. Au fost identificate diferite isoforme PML care diferă în regiunea lor C-terminală sau în lungimea regiunii centrale, dar rețin domeniul de legare la ADN, domeniul de dimerizare și un domeniu bogat în serină și prolină. Domeniul bogat în serină și prolină conține un situs de fosforilare a casein-kinazei II și patru repetiții consensus X-S-P-X care au fost găsite că reprezintă secvența minimă de identificare pentru o serin-treonin kinază care acționează pe o hidroxilază tirozinică și alte substrate. Toate isoformele PML păstrează domeniul de legare la ADN și domeniul de dimerizare și pierd domeniul bogat în serină și prolină și capătul C-terminal. Astfel, proteina PML/RARα conservă potențialul de interacțiune cu genele țintă și formarea de homo- și hetero- dimeri. Datorită substituției domeniului bogat în serină — prolină și a capătului C-terminal normal al lui PML, cu capătul C-terminal derivat din RARα, proteina himerică PML/RARα va fi reglată diferit de proteina normală PML.

PML/RARα este capabil de inhibare a diferențierii granulocitare indusă de RA, prezintă proprietăți transactivatoare alterate, comparativ cu tipul sălbatic RARα, de asemenea convertește RARα, care este un inhibitor, într-un activator AP1, dependent de AR. În absența lui AR, situație în care tipul sălbatic RARα nu are nici un efect, PML/RARα este un inhibitor. Datorită asocierii dintre activitatea AP1 și diferențierea hematopoietică are loc interferența cu calea AP1 și poate fi o explicație alternativă a rolului PML/RARα în APL.

Exprimarea proteinei de fuziune în celulele precursoare mieloide (care pot fi induse de vitamina D_3, factorul b și RA de creștere și transformare, hemul) a arătat: o pierdere a capacității de diferențiere când este indusă cu vitamina D_3 și factorul b de creștere și transformare, precum și creșterea sensibilității față de acțiunea de diferențiere AR.

Studiile de imounofluorescență cu anticorpi policlonali (anti-PML) au arătat că tipul sălbatic de PML, se concentrează în regiuni discrete în interiorul nucleului (0,5-1μm). Prezența acestor structuri marcate în toate tipurile de celule studiate ar putea duce la concluzia că sunt formațiuni nucleare a căror funcție n-a fost încă clarificată. În celulele APL, PML și PML/RARα au o localizare unică cu o distribuție fină, granulară. Tratamentul cu AR duce la reorganizarea drastică a marcării, refăcându-se distribuția tipului sălbatic PML. Această variație în organizarea nucleară a PML și PML/RARα ca urmare a tratamentului cu medicamentul AR în celulele APL poate fi corelată cu funcția normală a proteinei PML și cu efectul terapeutic al lui AR.

14. CONTROLUL EXPRESIEI GENICE DE CĂTRE RECEPTORII NUCLEARI

Mulți hormoni steroizi — estrogen, progesteron, aldosteronul, glucocorticoizii și androgeni — acționează prin declanșarea inițierii transcrierii. Hormonii steroizi sunt molecule hidrofobe care trec liber prin membrana celulară. Celula țintă conține un receptor citoplasmatic specific (R) care formează un complex (H-R) cu hormonul. Receptorul R suferă de obicei unele modificări (conformaționale sau chimice), după ce s-a format complexul H-R și devine R'. Complexul H-R' trece apoi prin membrana nucleară și pătrunde în nucleu. Aici complexul sau doar hormonul se prinde de cromatină, declanșând inițierea transcripției. Este posibil ca legarea hormonului la ADN să fie mediată de proteine de legare la ADN, dar nu este exclusă nici legarea directă a hormonului la ADN.

Bine cunoscută este inducția transcripției de către hormonul estrogen care stimulează sinteza ovalbuminei în oviductul de găină. Injectarea cu estrogen determină la găină sinteza în oviduct a ARNm pentru ovalbumină. Sinteza continuă atâta timp cât este administrat estrogenul sau hormonul estrogenoid (dietilstilbestrol). Atât înainte de administrarea hormonului și la 60 de ore, după îndepărtarea acestuia, nu se detectează ARNm pentru ovalbumină.

Când se administrează estrogeni la găină, numai oviductul sintetizează ARNm pentru ovalbumină. Celelalte celule nu pot sintetiza acest ARNm, deoarece ele sunt lipsite de receptorul de hormon din citoplasmă. Aceasta este explicația generală de ce nu toate celulele organismului răspund la un anumit hormon.

Prin legarea hormonului la ADN se facilitează legarea ARN polimerazei sau a unei proteine cerute de interacțiunea polimerazei cu ADN. O proteină deja legată la ADN este activată de hormon și această formă activă este necesară pentru legarea ARN polimerazei.

Un hormon determină o schimbare structurală în cromatină care face ca ADN să fie disponibil pentru ARN polimerază. Astfel, hormonul reglează transcripția genetică pe cale pozitivă, pe cale negativă sau pe cale selectivă adică, prin selecția anumitor promotori.

Pentru realizarea programelor genetice specifice, care în cazul receptorilor nucleari este de a controla aspectele multiple ale dezvoltării, creșterii celulare, diferențierii și homeostaziei, este esențială recunoașterea selectivă a elementelor cognate ADN, cis-activatoare de către reglatorii trans-activatori.

Receptorii pentru diverse grupuri de hormoni steroidici, tiroidieni și retinoidieni reprezintă o superfamilie nouă de gene reglatoare (receptori nucleari tipul II), factori de transcripție sensibili la ligand.

Regiunea N-terminală conține regiuni conservate de ADN, iar regiunea C-terminală pe cea a legării la hormon. Regiunea C-terminală reglează activitatea receptorului într-un mod care variază pentru fiecare receptor. Dacă este deletat domeniul C-terminal al receptorului pentru glucocorticoid, proteina rămasă doar cu domeniul N-terminal este constitutiv activă. Aceasta sugerează că, în absența steroidului, domeniul de legare la steroid împiedică receptorul în a recunoaște GRE (*glucocorticoid response element*), funcționând ca un reglator intern negativ. Adăugarea steroidului inactivează inhibarea, dând posibilitatea receptorului să se lege la GRE și să activeze transcripția.

Interacția dintre domenii este diferită în receptorii pentru estrogen. Dacă este deletat domeniul de legare la hormon, proteina se leagă la ERE (*estrogen response element*), dar nu este capabilă să activeze transcripția. Astfel, această regiune este cerută mai degrabă pentru activare decât pentru represarea activității.

Elementele de răspuns constau într-o secvență consensus cu două repetiții scurte (jumătăți de situsuri) PuG(G/T)TCA care formează fie palindroame, fie repetiții directe în care jumătățile de situsuri sunt separate de 1-5pb. Aceasta sugerează că receptorul se leagă ca multimer, astfel fiecare jumătate interacționează cu o subunitate (reminescență a interacției operator-represor λ).

Receptorii se împart în două grupe:

– receptorii pentru glucocorticoizi (GR), mineralocorticoizi (MR), androgeni (AR) și progesteroini (PR) care formează homodimeri, iar situsurile jumătăți sunt aranjate în palindrom;

– receptori tiroidieni (TR), retinoidieni (RXR și RAR), pentru vitamina D (VDR) care formează heterodimeri în care o subunitate este întotdeauna RXR, iar jumătățile de situsuri sunt aranjate ca repetiții directe (DR). recunoașterea acestui DR este influențată de lungimea secvenței separatoare după cum urmează:

1pb — RXR
3pb — VDR
4pb — T3R
5pb — RAR.

Un sistem clasic pentru studierea mecanismelor de acțiune a hormonilor steroidici este inducția transcrierii lui MMTV de către glucocorticoizi. Promotorul MMTV conține elemente de răspuns la hormoni (HRE), un situs de legare pentru membrii familiei factorilor nucleari (NF1), 2 motive degenerate octamerice.

Reglarea genelor eucariote se realizează prin interacția combinată a factorilor de transcripție de-a lungul elementelor cis-activatoare din cromatină. Inducerea hormonală a lui MMTV duce la legarea receptorilor hormonali și a factorilor de transcripție la un grup complex de situsuri din promotor. Accesul la aceste situsuri este modulat de organizarea precisă a poziției nucleosomilor, cu valoare reglatoare. Secvența ADN din promotorul MMTV este de așa manieră modificată conformațional, încât face imposibilă legarea factorilor de transcripție. Tratamentul hormonal, însă, conduce la o schimbare a poziției nucleosomilor, astfel încât să ofere o accesibilitate înaltă a regiunii sale centrale la DNază I. Analizele de *footprinting* genomic cu DMS și DNază I, în urma inducerii cu progesteron, arată faptul că situsul de legare pentru receptori hormonali, NF1 și proteinele octamerice de legare, este protejat, în timp ce pattern-ul nucleosomal în urma clivării cu DNaza I este parțial vizibil. Astfel, ca urmare a inducerii hormonale, nucleosomii care acoperă promotorul MMTV sunt rearanjați, dar nu îndepărtați.

Un model excelent în studiul interacțiilor dintre receptori nucleari îl oferă expresia genelor GH, a hormonilor de creștere (GH — **growth hormone**). Aceasta are loc în celule somatotropice pituitare, sub un control transcripțional complex. La șobolan, expresia genelor GH, atât in vivo cât și ex vivo, este stimulată de hormonii tiroidieni și glucocorticoizi, în celule pituitare. TR, RAR, RXR induc transcripția, iar VDR reduce marcant răspunsul la TR și RAR. Vitamina D nu inhibă expresia bazală a genei: represia se datorează interferenței transcripționale a lui VDR cu elementele de răspuns la hormonii tiroidieni și acizii retinoici.

Expresia genelor GH este reglată la nivel transcripțional și de factori GH de eliberare din hipotalamus. Aceștia acționează pe calea cAMP, prin creșterea nivelului unui factor de transcripție specific pituitar — GHF-1/Pit-1 ce se leagă la promotorul GH. TR și RAR interacționează cu GHF-1 și duce la o activare cooperativă a genei. O variantă GHF-2, produsă prin splicing alternativ, blochează activitatea transcripțională a hormonilor tiroidieni și retinoidieni. În plus față de aceste efecte directe asupra genei GH, hormonii tiroidieni și acizii retinoici reglează expresia genei GHF-1. Astfel, acidul retinoic crește, iar hormonul tiroidian descrește nivelul de ARNm și proteine GHF-1. Hormonul tiroidian reduce activitatea promotorului GHF-1 și răspunsul la esteri forbolici și cAMP. Această inhibiție nu implică mecanisme clasice de legare la HRE, ci se datorează interferenței transcripționale a lui TR cu alte elemente *enhancer* ale promotorului. De asemenea, există o interferență reciprocă între acțiunea transcripțională a lui TR și RAR și factorul de transcripție AP-1. Proteina c-Fos inhibă răspunsul promotorului GH la hormonii tiroidieni și acizi retinoici, iar receptorii lor inhibă expresia genei **c-fos** și activitatea AP-1, printr-un mecanism complex, care implică interacții proteină — proteină și proteină — ADN.

Structura nucleosomală este alterată de modificările posttranslaționale ale proteinelor cromozomale. Butiratul crește acetilarea histonelor, iar analogi ai nicotinamidei reduc ADP-ribozilarea. Aceste evenimente potențează efectul hormonilor tiroidieni și al acizilor retinoici asupra promotorului GH, evidențiindu-se astfel importanța structurii cromatinei asupra răspunsului transcripțional mediat de receptorii nucleari.

Un alt exemplu de interacții între receptori nucleari este acela al reglării transcripționale a complexului apoA-I, apoC-III și apoA-IV. Genele apo(A-I, A-II, A-IV, B, C-I, C-II, C-III și E) codifică pentru jumătatea proteinică a lipoproteinelor și determină soarta particulelor de lipoproteină. Genele apoA-I, apoC-III și apoA-IV sunt lincate în brațul lung al cromozomului 11. Direcția de transcripție a genei apoC-III este opusă față de aceea a genelor apoA-I și apoA-IV. Aceste gene conțin situsuri de legare pentru receptorii HNF-4, Arp-1, Ear-2 și Ear-3. Pentru activarea transcripției HNF-4 ce se leagă la elementul B (apoC-III), se cere prezența factorilor ce se leagă la regiuni din amonte ale promotorului (F-J). Această regiune a promotorului acționează ca un enhancer și potențează, de asemenea, transcripția mediată de HNF-4 a genelor apoA-I și apoA-IV. Astfel, această regiune intergenică se manifestă ca o regiune de control a locusului (LCR — **locus control region**) pentru clusterul apoA-I/apoC-III/apoA-IV.

S-au identificat proteine ce interacționează cu acest enhancer și s-au studiat efectele asupra transcripției condusă de promtorii proximali ai lui apoA-I și apoA-IV. S-a găsit că elementele F, H și J leagă factori ubicvitari ca Sp-1 și factori înrudiți ai Sp-1; G leagă Arp-1 și Ear-2; F, I și J leagă un factor nou CIIIF3 și un altul CIII-15 se leagă la elementul I.

Promotorul lui apoA-IV are o activitatea slabă in vivo, dar crește de 18 ori, atunci când enhancer-ul apoC-III se leagă la acesta, într-o orientare în tandem sau inversă. Mutații în HNF-4 diminuează capacitatea de activare transcripțională a enhancer-ului. Similar, legarea enhancer-ului apoC-III la promotorii proximali ai genelor apoC-III și apoA-I mărește de 10 ori activitatea acestora.

Acestea sugerează că efectul enhancer-ului apoC-III este mediat de interacții sinergice dintre factorii ubicvitari care se leagă la acesta.

15. SCHIMBAREA TIPULUI DE HEMOGLOBINĂ

Locusul β-globină conține 5 gene aranjate astfel 5' — ε — $^{G}\gamma$ — $^{A}\gamma$ — δ — β — 3' în ordinea în care ele se exprimă în timpul dezvoltării. Expresia genelor

ε-globină este restrânsă la perioada embrionară, în celule primitive eritroide nucleate. Când gena ε-globină este silențiată, sunt activate genele specific fetale ($G\gamma$ și $A\gamma$) și genele specific adulte (δ și β). Expresia genelor globinice în timpul dezvoltării suferă o schimbare transcripțională secvențială care implică o acțiune concertantă a elementelor promotoare proximale și distale: LCR (element reglator situat la 6-20 Kb, în aval de gena ε, conținând o serie de situsuri hipersensibile la DNaza I, specific eritroide) exercită o influență dominantă asupra cluster-ului; elementele proximale sunt implicate în expresia specifică de stadiu.

În cluster-ul uman β-globină, mutațiile non-deletate din promotorul γ-globinei nu interferă cu programul transcripțional și duc la persistența ereditară la adult a hemoglobinei fetale (HPFH).

Cutia distală CCAAT a promotorului genei γ-globină poate lega proteine ubicvitare CP1/NFY, factorul eritroid GATA1 și factorul NFE3 care nu este prea bine caracterizat. S-a arătat că mutațiile punctiforme sau delețiile cutiei distale CCAAT conduc la pierderea sau descreșterea dramatică a legării lui NFE3. Pe criterii imunologice, biochimice și de legare, s-a arătat că NFE3 nu este o formă alternativă a lui CP1/NFY sau GATA1.

Factorii de transcripție ai familiei GATA au 2 motive *Zn finger*, iar omologia este extinsă și în afara acestei regiuni. GATA1 este exprimat specific în celulele roșii, megacariocite, celule mastocite și celule testiculare. Deleția acestei gene prin recombinare omoloagă duce la oprirea dezvoltării eritroidului. Șoarecii homozigoți ***null*** mor *in utero* și manifestă diferite defecte inclusiv ale sistemului hematopoietic.

Deoarece caracteristica principală a reglării genelor globinice umane este silențierea genelor γ în perioada de adult, persoanele cu fenotip HPFH oferă posibilitatea de a se testa ipoteza dacă expresia continuă a genelor fetale în viața adultului este mediată fie de juxtapoziția elementelor **enhancer-like**, din proximitatea genelor γ, fie de deleția silențiatorilor localizați în regiunea dintre γ și β globină. S-au idetificat 2 elemente enhancer, localizate în imediată vecinătate a punctului de rupere 3' din HPFH-3 și deleției HPFH-6. Structura enhancer-ului HPFH-3 include o grupare complexă de repetiții directe, 6 copii ale motivului CCAAT, 2 motive pentru factorii de transcripție GATA-1, iar câteva segmente manifestă omologie înaltă cu SV40 și alți enhanceri globinici. Enhancer-ul HPFH-6 este localizat între punctul de rupere 3' a lui HPFH-6 și thalassemia Chinese ($A\gamma\delta\beta^0$). Retenția sa, în prima, și pierderea sa, în a doua deleție (asociat cu o expresie mai puțin eficientă a HbF) explică fenotipul distinct, rezultat. Secvențierea miezului enhancer-ului relevă 2 motive consensus de recunoaștere pentru GATA-1 (AGATAA). Ambii enhanceri activează, de asemenea, promotorul ε-globinei, dar nu și promotorul δ și β, în timp ce represează puternic promotorul DHFR. Analiza de funcție a regiunii $A\gamma$ — $\psi\beta$ pentru prezența regiunii reglatoare negative sau a silențiatorilor relevă poziția a două regiuni reglatoare negative, localizate la 0,4-1,6 Kb de capătul 3' al genei Aγ. În aceste două regiuni s-a observat un grad înalt de omologie cu două elemente reglatoare a secvenței consensus negative a lizozimului din pui de găină, gena ε-globină, elemente silențiatoare din drojdie și secvențe consensus de legare a proteinei represor Zn finger numită CSB1. Aceste informații sunt de așteptat să releve noi elemente adiționale ale cluster-ului, implicate în schimbarea tipului de hemoglobină umană.

16. TRANSCRIPȚIA SPECIFICĂ FICATULUI

HNF1 și vHNF1 sunt factori de transcripție ce conțin homeodomenii strâns înrudite, implicate în expresia unui grup mare de gene exprimate în hepatocite și în alte câteva țesuturi cu origine endo- și mezodermală. Ele au aceeași secvență de specificitate și aparțin unei noi subclase a homeoproteinelor ai căror membrii leagă ADN, ca homeo/heterodimeri, printr-un homeodomeniu atipic; vHNF1 participă în deciziile luate în timpul dezvoltării timpurii, mai devreme decât HNF1.

Promotorul vHNF1 conține două secvențe proximale de recunoaștere a proteinelor octamerice și un element în amonte, capabil să lege HNF4 și alți membrii ai familiei de receptori nucleari, de exemplu Coup/Ear3 și Arp-1. În experimentele de cotransfecție tranzientă, situsul de legare pentru HNF-4 al promotorului vHNF1 este reglat diferit de acești receptori nucleari și manifestă caracteristici unice, comparativ cu situsurile înrudite caracteristice altor promotori, de exemplui promotorul pentru HNF1, ApoC-III și ApoA-I.

Natura moleculară a lui HNF1 ca și activitatea de legare la ADN poate varia de la celulă la celulă și în timpul dezvoltării. HNF1 și vHNF1 pot forma homo și heterodimeri cu situsuri identice de legare specifică la ADN. În plus, procesarea alternativă a ARN-ului (poliadenilare și splicing) generează câteva forme diferite care diferă în proprietățile lor de transactivare. Una dintre formele vHNF1 clonate din ficatul uman este chiar un represor dominant negativ.

Gena transferinei (Tf) umane folosește diferite combinații de elemente reglatoare în subseturi diferite de celule pentru obținerea unei exprimări specifice de țesut.

În sistemul hepatic, promotorul minimal specific de țesut al Tf interacționează prin regiunea PR I și PR II, cu factorii de transcripție HNF4 și C/EBP. Cu regiunea PR I interacționează și alte proteine. Una a fost identificată și numită PYPB sau PTB. Este un factor ubicvitar, apare devreme în dezvoltarea embrionului de șoarece și interacționează specific cu o secvență ADN unicatenară, bogată în pirimidină. Activitatea enhancer-ului specific de țesut hepatic este rezultatul asocierii dintre

HNF-3 și NF1 și interacționează cu un complex multiproteinic, format din 3 proteine ubicvitare.

În linia B103 a celulelor neuronale, promotorul minimal conține 3 situsuri de legare a proteinelor: PR I, PR II și CR I. În extractul nuclear total proteinic din creier n-a fost identificat HNF4. La PR I se leagă factorul de transcripție Coup/Ear3, aparținând superfamiliei de receptori nucleari. Experimente de co-transfecție, în metode de exprimare tranzientă, au arătat că factorul de transcriere Coup represează activ promotorul Tf.

Factorii HNF sunt esențiali în transcripția multor gene specifice ficatului, ca de exemplu a genei care codifică pentru piruvat kinaza tipul L (L-PK). Această genă are 2 promotori, dintre care unul este activat de glucoză și insulină și inhibat de cAMP. Acest promotor conține de la 3' la 5' situsuri de legare pentru factorii: HNF1, NF1, HNF4 și elementul de răspuns la glucoză GIRE care este, de asemenea, un element de răspuns negativ la cAMP. În mod normal, cooperarea strânsă dintre GIRE și situsul contiguu de legare HNF4 este esențială pentru un răspuns corect, pozitiv, la glucoză/insulină sau negativ la cAMP, dar oligomerizarea motivului GIRE poate oferi parțial același tip de răspuns. În hepatocite, efectul permisiv al insulinei asupra activării promotorului dependent de glucoză a L-PK poate fi înlocuit de un vector de expresie glucokinazic, de o concentrație scăzută de fructoză, care acționează ca un activator alosteric al glucokinazei reziduale, prezente în culturile de hepatocite, într-un mediu lipsit de insulină. În plus, câteva linii celulare în care glucokinaza dependentă de insulină a fost înlocuită de alte isozime hexokinazice, dependente de insulină, răspund la glucoză în absența insulinei al cărui efect major pare să fie acela de a stimula sinteza glucokinazică și apoi să permită trecerea glucozei fosforilate în glucoză-6-P. Efectul gucozei-6-fosfat este întârziat, are loc o sinteză proteinică continuă și acest tip de metabolism nu este înrudit cu metabolismul său, prin calea Embden-Meyerhof, așa cum s-a demonstrat prin mimarea efectului 2 d-glucoză-6-P, în câteva celule. Similar, există elemente de răspuns la glucoză/carbohidrați și în alte gene, caracterizate prin prezența cutiei CACGTG.

Domeniul **forkhead** definește o clasă de factori de transcripția cu rol important în exprimarea genelor specifice de țesut hepatic la șobolani, ca și în gastrularea și organogeneza la **Xenopus laevis** și șoareci. Domeniul **forkhead** este necesar și suficient pentru legarea la ținta ADN, așa cum s-a arătat pentru familia HNF-3. Au fost clonate 12 noi gene din librăriile cADN și genomice de șoarece, în plus față de echivalenții genelor HNF-3 α, β, γ: fkh 1-12. Acestea au un grad înalt de similitudine cu genele **forkhead** de **Drosophila**, având o identitate de 57-67%, din domeniul **forkhead**. Studii de hibridizare in situ asupra embrionului din timpul gastrulării și perioadei mijlocii a gestației au sugerat un rol pivotal pentru familia de gene **HNF-3/ forkhead** în dezvoltarea timpurie. HNF-3 β este prima genă activată și se exprimă în aria de la capătul anterior al liniei primitive din cele trei straturi germinale. Ulterior, este transcris HNF-3 α în endodermul primitiv al invaginării din partea anterioară a intestinului, în timp ce HNF-3 γ apare în diferențierea părții posterioare a intestinului.

În dezvoltarea embrionului, cele trei gene au un rol funcțional în regionalizarea endodermului. ARNm pentru HNF-3 α și β a fost, de asemenea, detectat în celulele epiteliului ventral neural, cordul mezodermal și notocord. S-au făcut analize privind pattern-ul de exprimare pentru **fkh-1** — **fkh-12**. Studii de hibridizare in situ, la nivelul embrionului din perioada gastrulării și gestației mijlocii au arătat distribuții distincte ale transcriptelor pentru genele studiate. Astfel, ARNm pentru **fkh-2** este găsit pentru o perioadă de timp limitată în neuroectodermul anterior și partea anterioară a intestinului; **fkh-4** — în arii distincte ale diencefalonului; **fkh-5** — în creier, măduva spinării și părți ale somitelor; **fkh-6** — în mezenchimul capului și, mai târziu, în intestinul mezodermal.

17. METILAREA ȘI DEZVOLTAREA ONTOGENETICĂ

Metilarea ADN la poziția 5' a citozinei din cadrul dinucleotidului CpG este implicată într-o gamă largă de fenomene biologice: expresia genelor specifice de țesut, inactivarea cromozomului X, imprinting-ul genomic etc. Pattern-ul de metilare anormală ADN este asociat cu alterarea expresiei genice dintr-o serie de boli genetice și tumori.

Pattern-ul de metilare genomică este propagat prin mitozele succesive, menținând stabil structura ADN și starea transcipțională a genomului. Sunt două mecanisme posibile prin care metilarea poate supresa expresia genică: mecanisme directe — unii factori de transcripție precum E2F1, nu se pot lega la secvențele lor de recunoaștere, când acestea sunt metilate. În contrast, factori de transcripția ca Sp1, nu sunt sensibili la starea metilată a situsului de recunoaștere. În acest caz, metilarea represează transcripția prin mecanisme adiționale: mecanisme indirecte — molecule represoare (*methyl CpG binding proteins* — **MeCPs**), singure sau împreună cu alte componente ale cromatinei se leagă specific la ADN metilat.

Silențierea genelor mediată de metilare are loc după ce cromatina este asamblată, iar metilarea are efecte represive transcripționale, adiționale celor ale nucleosomului.

În genomul de la mamifere, aproximativ 60-90% din dinucleotidele CpG sunt metilate și majoritatea sunt dispersate. În orice caz, insulele CpG (clusteri de secvențe CpG) din regiunea promotoare a genelor activ transcrise sunt aproape nemetilate. Sunt două tipuri de proteine MeCP: MeCP1 și MeCP2. MeCP1 se leagă preferențial la ADN ce conține un cluster CpG metilat simetric, iar MeCP2 se leagă la o singură pereche CpG metilată. MeCP2 este mai abundentă decât MeCP1 și se crede că este asociată, în principal, cu CpG-urile metilate, dispersate, pentru a bloca o transcripție inadecvată. MeCP2 este omoloagă cu proteina de legare la MAR.

MBD1 reprezintă o componentă a complexului MeCP1 și este capabilă de represie transcripțională in vitro a unui promotor adenoviral metilat. Pe lângă MBD1 au mai fost descoperite și alte astfel de proteine: MBD2, MBD3 și MBD4. Expresia lui MBD1 și MBD2 a fost detectată în țesuturile somatice, dar nu și în celulele stem embrionare sau celulele germinale. MBD1 are un pattern de localizare distinct față de MeCP2, care este dispersat în tot nucleul. Astfel, aceste două proteine au roluri diferite în interacția cu ADN metilat.

MBD1 este prezent mai ales în regiunile eucromatice; complexele ce conțin MBD1 au ca țintă genele metilate pe care le represează și duc la formarea de regiuni heterocromatice, în interiorul regiunilor eucromatice. Pe de altă parte, MBD1 se concentrează în regiunea pericentromerică a cromozomului 1q12, care este cunoscută ca fiind cea mai mare regiune heterocromatică adiacentă centromerului. De notat că heterocromatina juxtacentromerică din cromozomul 1 se asociază cu fenomenele de hipometilare și recombinare în boli genetice umane rare, imunodeficiențe, instabilitatea regiunilor centromerice, anomalii faciale și multe forme de cancer.

Dintre proteinele care conțin MBD, doar MBD1 are un domeniu bogat în cisteină (CXXC), care a fost original găsit în ADN metiltransferază. Prin metode de PCR-transcripțional revers s-au găsit patru isoforme ale MBD1 (MBD1v1, 2, 3, 4) ca rezultat al splicing-ului alternativ al domeniului CXXC și capătului C-terminal. Acest domeniu are rol reglator, fiind responsabil de răspunsul diferit la situsurile mai mult sau mai puțin metilate. Aceste isoforme represează preferențial transcripția promotorilor metilați, iar MBD1v1 și –v2, care conțin 3 domenii CXXC, afectează, de asemenea, și activitatea promotorilor nemetilați.

Aceste efecte se manifestă și în celulele sistemelor la care lipsește metilarea genomică. Cel mai bine cunoscut exemplu este acela al reglării genelor homeotice de la **Drosophila**. Pe baza fenotipurilor homeotice reciproce din câteva mutante, au fost identificate două clase de gene: grupul *thritorax (trx G)*, responsabil pentru susținerea stării active a expresiei genelor homeotice, și grupul *Polycomb (Pc G)*, care codifică pentru represori stabili.

Activarea transcripției de către Sp1 a promotorilor metilați este inhibată de toate isoformele MBD1, în timp ce isoformele v1 și v2 reduc activitatea transcripțională a lui Sp1 și la promotorii nemetilați. Toate acestea sugerează că isoformele MBD1 au un rol important în stabilirea și menținerea stării locale a cromatinei, implicată în reglarea activității genice.

18. BATERIILE GENICE ȘI „LOGICA LOR ORGANIZATORIC-FUNCȚIONALĂ"

Problema modului în care dezvoltarea ontogenică a unui organism este codificată în structura ADN a preocupat pe mulți cercetători, încă din momentul descoperirii rolului genetic al acestei macromolecule. Astăzi, cu această problemă se ocupă GENOMICA FUNCȚIONALĂ. Expresia diferențiată a genelor în cursul dezvoltării implică reglarea transcrierii genice prin interacțiuni complexe dintre diferite molecule și celule, desfășurate în cursul diferențierii celulare.

Dezvoltarea embrionară reprezintă rezultatul unor expresii genice diferențiate spațial și temporal al căror control este programat în secvența de nucleotide din ADN. Încă de la sfârșitul secolului al XIX-lea se dovedise că programul de dezvoltarea a unei ființe este o proprietate ereditară a organismului dependentă de informația conținută în interiorul ovulului și spermatozoidului. La mijlocul secolului al XX-lea, R. Britten și E.H. Davidson au elaborat un model logic de activitate genică diferențiată în cursul dezvoltării ontogenetice. Acest model a fost ulterior susținut cu unele dovezi, elucidându-se multe aspecte referitoare la semnalizările celulare-moleculare, mecanisme esențiale în reglarea dezvoltării embrionare. Analiza mecanismelor **cis**-reglatoare a permis evidențierea multor dintre asemenea componente de semnalizare. Secvențierea genică a permis stabilirea componentelor moleculare implicate în asemenea semnalizări. În sfârșit, revitalizarea argumentelor evolutive a permis identificarea evenimentelor genomice implicate în schimbarea planurilor arhitecturale ale corpului animalelor pluricelulare. Analiza evolutivă a dezvoltării a permis explicarea mecanismelor genomice de reglare în filogenia moleculară, elucidându-se etape importante ale evoluției vieții.

Există două mecanisme generale de control al activității genice: **cis**-activatoare și **trans**-activatoare. Elementele reglatoare **cis**-activatoare reprezintă regiuni din vecinătatea fiecărei gene care conțin motive cu specificitate de secvență la care se leagă proteine reglatoare spre a afecta expresia acelei gene, plus setul de gene care codifică pentru aceste proteine reglatoare specifice cum ar fi, de exemplu factorii de transcripție. Uneori, aceste două părți ale sistemului reglator genic imediat sunt desemnate sub denumirea de **aparat reglator cis**, respectiv **aparat reglator trans**. Evident, aparatul **transreglator** poate fi într-un sens mult mai larg. De regulă însă, molecule **trans-reglatoare** care interacționează direct cu ADN, recunosc și se leagă la situsul secvenței țintă **cis-reglatoare**. Elementele trans-reglatoare sunt de o mare diversitate și ele sunt sintetizate în citoplasmă (proteine) sau în nucleu (molecule de ARN), fiind circulate pe căile de semnalizare, reprezentând proteine adaptoare, cofactori sau alte categorii de substanțe celulare care interferă cu activitatea factorilor de transcripție.

Cei mai importanți determinanți genomici ai diversității dezvoltării organismelor animale sunt elementele reglatoare care codifică programul genetic al dezvoltării. În situsurile țintă **cis-reglatoare** din ADN al fiecărei specii se întâlnesc diferențele majore de secvență care condiționează forma acestora, de la cele mai generale, până la cele mai amănunțite detalii particulare ale morfologiei sale. Deoarece elementele cis-reglatoare constau din secvențe genomice de ADN, ele sunt aceleași, în fiecare celulă a organismului animal, și organizarea lor este un caracter ereditar al speciei. Printre cele mai importante dintre aceste elemente sunt acelea care controlează **genele reglatoare, acestea fiind genele care codifică pentru factorii de transcripție, respectiv pentru proteine reglatoare.** Asemenea gene ocupă poziții cheie în marile rețele reglatoare în care sunt incluse toate genele țintă ale lor, precum și genele reglatoare care codifică proteine ce controlează propria lor activitate. Este construit astfel un sistem de control riguros al genomului, funcțional în desfășurarea proceselor de dezvoltare și de evoluție a planurilor de organizare a corpului animal sau vegetal.

Diferențele în dimensiunea genomului la speciile de animale, precum insecte, pești și amfibieni, uneori de ordinul zecilor, chiar între specii înrudite, nu sunt asociate cu aceleași diferențe în complexitatea populației de ARNm, înțelegând prin complexitate diversitatea nucleotidelor din secvența ARN, respectiv lungimea secvenței totale, atunci când molecule singulare ale fiecărui tip diferit de ARNm reprezentat în populația analizată sunt întinse cap-la-cap.

Analiza comparativă a două genuri de amfibieni arată că dimensiunea genomului de **Xenopus** este de zece ori mai mică decât aceea de **Triturus.**

ARN-urile materne, cu complexitate egală la acești amfibieni, sunt generate în cursul ovogenezei, în stadiul de diploten, cu fenotip cromozomal **lampbrush,** în care complexele transcripționale sunt prezente spectaculos în mii de bucle cromozomale laterale. Procesele transcripționale din buclele cromozomale lumpbrush mari, de la **Triturus,** și cele mult mai mici, de la **Xenopus,** au fost studiate cu mare atenție, prin metode citologice și biochimice de către O. Miller și J. Gall. Pe această cale, s-a putut înțelege modalitatea prin care genomuri foarte diferite ca mărime generează o complexitate atât de apropiată (fig. 1). Rezultă că atât secvențele necodificatoare transcrise, reprezentate de sectoarele intergenice și introni cât și lungimea secvențelor netranscrise sunt mult mai mari în cromozomii lumpbrush de la **Triturus,** decât în cromozomii corespunzători, de la **Xenopus.**

Aceasta are ca rezultat existența unei informații genetice utilizată în producerea ovulului care se va dezvolta prin fecundare într-un embrion de amfibian.

Actualmente, există date referitoare la estimarea globală a conținutului de gene per genom, la numeroase specii cu dimensini diferite ale genomului, așa cum se prezintă în figura 2. Genomul viermelui nematod **Caenorhabditis elegans** conține aproximativ 18.400 gene, pe când nevertebratul cordat **Ciona** și insecta **Drosophila** au un număr de gene, aparent mai mic. La ariciul de mare **Strongylocentrotus purpuratus** se află un număr dublu de gene, față de drosofilă, la care s-au identificat 13.600 de gene. La om și la peștele **Fugu rubripes**, al cărui genom are o dimensiune aflată la limita inferioară, pentru vertebrate, sunt estimate 40.000 gene. Se crede că în evoluția timpurie a vertebratelor au avut loc cel puțin două duplicații ale întregului genom, această informație fiind bazată în principal pe numărul mai mare de copii genice dintr-o anumită familie genică, din genomurile vertebratelor. Astfel, genomurile vertebratelor includ mai multe gene din aceste familii decât au deuterostomienii inferiori, adică ascidiile, echinodermele și cefalocordatele (**Amphioxus**). Argumentul forte pentru această afirmație este adus de complexele de gene **hox**: animalele au patru complexe de gene **hox**, localizate în patru cromozomi diferiți (Ruddle și colab., 1994; McGinnis și Krumlauf, 1992), pe când nevertebratul cordat **Amphioxus** are doar un singur complex de gene **hox** (Garcia — Fernandez, și Holland, 1994) ca și **S. purpuratus** (Martinez și colab., 1999). Dacă vom împărți cele 40.000 de gene estimate de la specia mamă la patru (Rubin și colab., 2000) va rezulta o valoare ceva mai mare de valoarea **„pachetului de bază“** adică 2×10^4 gene (fig. 2).

Există date interesante privitoare la pierdere de gene din genomul unor anumite linii evolutive. Astfel, genomul de **C. elegans** nu conține o genă care codifică ligandul semnalizator intercelular Hedgehog (**Hh**) care este esențial în dezvoltare, atât la **Drosophila**, cât și la cordate.

Gena **hh** este astfel un exemplu de pierderea a unui component al semnalizării la toate animalele cu simetrie bilaterală, din linia care a condus la diferențierea lui **Caenorhabditis elegans**. Numai că, gena care codifică factorul de transcripție din aval pe care o afectează semnalizarea Hh, respectiv gena care codifică reglatorul transcripțional **Gli** sau **Cubitus Interruptus**, este prezentă în genomul de **C. elegans**. Tot astfel sunt și genele care codifică proteinele similare receptorului transmembranar Patched, implicat în semnalizarea Hh, la alte organisme (Ruvkum și Hobert, 1998). În fiecare linie a animalelor bilaterale, deși sunt prezente toate familiile genice, reglatoare și semnalizatoare, se constată o diversificare diferită, adică diferite genomuri ale acestor animale pot avea diferite numere de gene codificatoare de factori de transcripție ce aparțin diferitelor subfamilii ale reglatorilor cu homeodomeniu, reglatorilor ETS, reglatorilor cutiei T, receptorilor nucleari sau reglatorilor de tip helix aripat și diferitelor numere de liganzi Dpp sau TGFβ. În plus, duplicația și diversificarea acestor familii și subfamilii genice sunt totdeuna acompaniate sau conduse de diversificarea rolului lor funcțional în dezvoltare. Acesta este un proces major în evoluția animalelor cu simetrie bilaterală.

Acum se știe că un repertoriu comun de tipuri de căi reglatoare transcripționale și de semnalizare constituie moștenirea comună a bilateralelor, a căror utilizare subliniază toate formele de dezvoltare bilaterală. Acest argument se bazează și pe multe alte clase de gene, precum genele codificatoare de proteine citoscheletale sau enzime care intervin în diferite funcții metabolice, și mai ales genele care codifică proprietățile multor tipuri celulare diferențiate la toate lateralele, precum celulele musculare, neuronii, fotoreceptorii, celulele secretoare etc.

PĂRȚILE LUCRATIVE ALE GENOMULUI SUNT GENELE ȘI ELEMENTELE CIS-REGLATOARE. Deoarece clasele cheie de gene sunt aceleași la toate bilateralele, rămân să facă diferența genele aparatului reglator. Arhitectura internă a elementelor cis-reglatoare determină cum va funcționa fiecare genă. Arhitectura rețelelor în care acestea sunt interconectate determină dezvoltarea seturilor de gene în spațiul și timpul procesului de dezvoltare. Cândva, se deducea faptul că arhitectura reglatoare genomică constituie baza structurală, genetică, pentru trăsăturile morfologice ale animalelor, dar acum cunoaștem acest fapt cu certitudine.

19. ARHITECTURA REGLATOARE A GENOMULUI

Elementele cis-reglatoare pot fi considerate drept unități procesatoare de informații, prinse în rețeaua reglatoare, astfel că ele primesc multiple **input**-uri, sub forma unor numeroși factori de transcripție care se leagă în interiorul lor. Input-urile (intrările) variază depinzând care genă este funcțională într-o celulă dată și de momentul procesului de dezvoltare în care aceasta este activă. **Output**-ul (ieșirea din sistem) reprezintă „**instrucția**“ dată aparatului bazal de transcripție care determină dacă o genă trebuie să fie silențiată, sau să fie activă cu o anumită intensitate. Dacă gena codifică un factor de transcripție, **output**-ul conduce la toate celelalte elemente **cis-reglatoare**, în cadrul cărora există situsuri țintă funcționale pentru factorul de transcripție. Se spune despre acestea că reprezintă legături „din aval“, pe când **input**-urile spre o genă reglatoare sunt terminali, în propriul lor sistem cis-reglator al legăturilor sale „din amonte“. Arhitectura internă a unui element **cis-reglator** este aceea care îl face pe acesta capabil să „proceseze“ diferiți stimuli (**input**-uri) pe care îi primește, convertind acești stimuli într-un singur răspuns (**output**). Numai verificând semnificația funcțională a situsurilor țintă specifice pentru factorul de transcripție din cadrul unui element **cis**-reglator vom înțelege ce semnificație are secvența ADN genomic a unui element, iar semnificația funcțională a unei secvențe de ADN genomic ar putea fi considerată cea mai importantă problemă în bioștiință.

Funcția procesatoare de informație a unui element cis-reglator constituie legătura dintre diferite circumstanțe care apar în celulă, iar capacitățile de răspuns sunt încorporate în secvența reglatoare a organismelor cu simetrie bilaterală. O trăsătură generală a arhitecturii cis-reglatoare la organismele cu simetrie bilaterală este aceea că diferitele faze ale expresiei anumitor gene sunt mediate frecvent de diferite elemente cis-reglatoare, numite și „module“. Utilizarea unui asemenea termen în locul celui de „**enhancer**“ are avantaje, deoarece funcțiile acestor elemente pot fi mai complexe și integrative decât cele sugerate de verbul „a amplifica“ și în realitate, în unele celule, unele module funcționează mai curând spre a represa, decât spre a stimula transcripția.

Structurile morfologice ale organismelor cu simetrie bilaterală nu sunt niciodată produsul unor gene unice sau al unor sisteme reglatoare singulare. Măsurători directe asupra complexității ARN și datele privitoare la EST (acronim derivat de la *„expressed sequence tagged“*), obținute prin analiza băncilor cu cADN, pentru anumite țesuturi, confirmă afirmația potrivit căreia multe sute și adesea chiar mii de gene trebuie să fie exprimate spre a dirija crearea unui anumit țesut, a unei anumite părți a corpului sau a unei structuri multicelulare. Aceste gene sunt controlate în spațiul și timpul de dezvoltare de mari rețele reglatoare de gene ale dezvoltării (fig. 3). În concepția lui Davidson (2001) rețeaua arhitecturală reprezintă organizarea legăturilor reglatorii care conectează elementele cis-reglatoare prin interacțiuni **cis-trans** și, abia în zilele noastre, începe să fie descifrată natura reală a acestor rețele. Schimbările genomice care modifică această rețea crează noi direcții în procesele de dezvoltare, deoarece ele pot afecta activitățile unor seturi mari de gene. De exemplu, inserția sau apariția unor noi molecule **cis**-reglatoare în vecinătatea unei gene care contolează o baterie de alte gene, face ca aceste gene să fie exprimate în diferite domenii spațiale ale unui embrion. Tot astfel, schimbări **cis**-reglatoare în situsurile țintă conduc la adăugarea de gene la bateriile preexistente de gene, după cum schimbările din situsul țintă aduc subelemente ale rețelei sub controlul diferitelor funcții semnalizatoare. Rețeaua arhitecturală este de cele mai multe ori specificată de identitatea situsurilor țintă din cadrul tuturor elementelor cis-reglatoare participante. Analiza sistemelor genomice cis-reglatoare și a interrelațiilor dintre ele permite înțelegerea modului în care genomurile codifică proprietățile organismelor.

Dezvoltarea reprezintă executarea programului genetic pentru construirea unui organism aparținând unei anumite specii. Până ce se atinge forma finală a organismului în fiecare element morfologic al unui organism în cursul dezvoltării sale ontogenice, subprogramele genetice exprimate în celulele progenitoare sunt tranziente, reprezentând stații în calea ce duce la stadiul final al organizării spațiale. Tranziența implică control temporal de o mare precizie. Există sisteme **cis**-reglatoare care funcționează doar pentru câteva ore, din întreaga durată de viață a organismului, și doar pentru aceste puține ore sunt necesare funcțiile mediate de genele care sunt activate în acest timp, ele nefiind necesare în alte perioade ale vieții individului. De exemplu, stabilirea asimetriei dorso/ventrale (D/V) în embrionul de broască poate apare în decursul unei perioade cruciale care durează aproximativ o oră, timp în care genomurile sunt activate la sfârșitul stadiului de blastulă. Genele care codifică reglatorii transcripționali ai unui homeodomeniu particular, precum **viz**, **siamois**, **twin** și **goosecoid** sunt apoi tranzient activate, în mod precis, specific, în partea dorsală a embrionului. Semnalizarea celulară și alte evenimente reglate de către acești factori sunt necesare încă înainte de începerea gastrulării. Tot astfel, produșii unor anumite gene funcționale în anumite tipuri de celule diferențiate sunt necesari numai în anumite stadii specifice și numai în acele celule. De exemplu, proteinele „lipicioase“ sunt produse în glandele salivare ale larvelor de **Drosophila**, exact înaintea stadiului de pupă (Backendorf și Kaftos, 1976). Aceste proteine adezive, codificate de o mică familie de gene exprimate coordonat, sunt necesare spre a fixa larva de o suprafață uscată, spre a începe metamorfoza insectei și, în consecință, ele sunt sintetizate doar în ultimele câteva ore ale perioadei larvare de 4 zile, și nu vor mai fi sintetizate niciodată, în cursul vieții individului, nici înainte și nici după acest moment. NATURA SEMNALELOR (INPUT-URILE) SPECIFICE, utilizate spre a fi exercitată o asemenea reglare a genelor tranzient expresate, este determinată de către situsurile țintă care sunt interconectate în sistemele **cis**-reglatoare ale acestor gene.

Formarea pattern-ului este un termen frecvent utilizat, deoarece modelele spațiale apar la fiecare nivel al organizării biologice de la subcelular, la cel organismic. În genomica funcțională, acesta este aplicat în mod specific la procesul de dezvoltare prin care domeniile spațiale ale celulelor nespecificate sunt desemnate drept „stări de reglare“, creând în cele din urmă câmpuri de celule care vor da naștere la diferite părți ale unei structuri, ale unui organ sau ale unui organism. Evenimentele timpurii ale formării pattern-ului stabilesc elementele de bază ale planului corpului, cum ar fi segmentarea metamerică care apare de timpuriu în embriogeneza musculiței, sau axa anterioară/ posterioară (A/P), precum și asimetria stânga — dreapta la un șoarece. Evenimentele ulterioare de formare a pattern-urilor definesc elemente mai detaliate și mai mici, cum ar fi aranjamentul perișorilor senzitivi, la musculiță sau digitația membrelor, la șoarece. Procesele de formare a pattern-ului sunt progresive, în sensul că pe măsură ce are loc dezvoltarea, elementele spațiale sunt specificate cu o rezoluție crescător rafinată. În toate cazurile, formarea pattern-ului necesită apariția în domeniile existente în celule, de noi subdomenii, având loc o succesivă partiție a acestora.

În miezul mecanismelor de formare a pattern-ului stă procesul specificației regionale. Noile subdiviziuni ale unui domeniu celular existent sunt create prin expresia unuia sau a mai multor factori de transcripție, în interiorul unei regiuni delimitate. Aceasta stabilește o nouă stare reglatoare în această regiune, diferențiindu-o de celelalte celule și pregătind programul pentru desfășurarea următoarelor evenimente ale dezvoltării. În acest proces, intervin sistemele **cis**-reglatoare care realizează funcția crucială de integrare a semnalizării, lineației și altor input-uri care definesc regiunile spre a suferi specificitate regională. La rândul lor, factorii de transcripție pe care ei îi controlează oferă input-uri specifice în aval în activitățile transcripționale ale altor gene, la următorul nivel al rețelei reglatoare. Genele implicate codifică factori de transcripție exprimați spațial, precum și elemente ale sistemelor de semnalizare intercelulară. Din această cascadă de evenimente de activare genică rezultă natura progresivă a procesului de formare a pattern-ului.

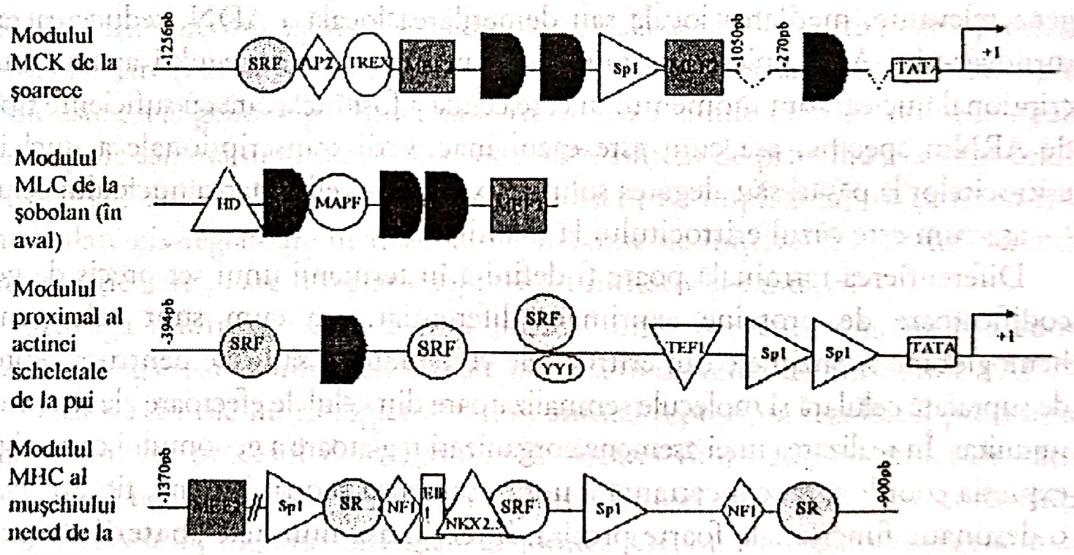

Modulul MCK de la șoarece
-1256pb
SRF
AP2
TREX
MEF2
Sp1
MEF2
-1050pb
-270pb
TATA
+1
Modulul MLC de la șobolan (în aval)
HD
MAPF
MEF2
Modulul proximal al actinei scheletale de la pui
-394pb
SRF
SRF
SRF
YY1
TEF1
Sp1
Sp1
TATA
+1
Modulul MHC al mușchiului neted de la șoarece
-1370pb
MEF2
Sp1
SR
NF1
EB 1
NKX2.5
SRF
Sp1
NF1
SR
-900pb

Fig. 4. — *Elementele cis-reglatoare ale câtorva gene musculare specifice.* Aceste gene pot fi considerate ca membre ale bateriei de gene specifice mușchiului: MCK, creatin kinaza musculară; MLC, lanțul ușor al miozinei; MHC, lanțul greu al miozinei. Ele posedă aceleași sitsuri țintă pentru câțiva factori de transcripție specifici: MEF2, SRF, familia MyoD (MDF) factorul bHLH. În plus, fiecare genă are și alte situsuri țintă specifice arătate aici cu simbolurile deschise. Secvența situsului țintă a genelor MHC din mușchiul neted este înalt conservată la șobolan, șoarece și iepure, fiind susceptibilă a juca un rol reglator; factorii din familia MyoD nu se exprimă în mușchiul neted, iar situsul țintă lipsește prin urmare, din acest element reglator (modificat din Davidson, 2001).

Toate metazoarele produc tipuri diferențiate de celule, dar numai cele cu bisimetrie laterală dau naștere la șiruri morfologice tridimensionale de tipuri celulare diferențiate terminal pe care le numim „organe“ și numai la formele corpului adult al bilateralelor straturile sau tuburile de tipuri celulare mezodermale diferențiate constituie componente majore ale tuturor părților corpului. Diferențierea celulară la bilaterale este realizată cu precizie, astfel că, în condiții normale, asemenea celule nu mai pot realiza alte funcții, iar atunci când ele își păstrează capacitatea replicativă, ele vor da naștere doar la celule asemănătoare lor. Sunt foarte puține cazurile de transdiferențiere a celulelor înalt diferențiate: celule diferențiate suferă un proces de dediferențiere, pentru ca, ulterior, să sufere o rediferențiere într-o altă direcție. Celulele care se caracterizează prin ceea ce embriologii au numit **angajare**, deoarece ele au suferit o diferențiere terminală, prezintă funcționale mecanisme stabilizatoare care blochează anumite pattern-uri transcripționale, desfășurând în schimb alte sinteze, specifice lor. Căile unei asemenea stabilizări a circuitelor feedback din rețeaua genică care reglează citodiferențierea sunt diverse: schimbări ale conformației structurale ale domeniilor cromatinice care includ sistemele reglatoare ale unor gene relevante, metilarea locală sau demetilarea locală a ADN, reducerea ratei turnover-ului ARN, pierderea sau inactivarea totală a întregului aparat transcripțional nuclear, din momentul în care celula a fost încărcată cu suficiente tipuri de ARNm specific, așa cum este cazul inactivării transcripționale a nucleilor eritrocitelor la păsări sau alegerea soluției extreme — eliminarea nucleului celular — așa cum este cazul eritrocitului la mamifere.

Diferențierea terminală poate fi definită în termenii unui set precis de gene codificatoare de proteine exprimate diferențiat, așa cum sunt cele pentru hemoglobine și enzimele din eritrocitele vertebratelor sau cele pentru receptorii de suprafață celulară și molecule semnalizatoare din celulele efectoare ale sistemului imunitar. În realizarea unei asemenea organizări reglatoare a genomului care asigură expresia coordonată, concertantă a unor asemenea seturi de gene, fiecare având o destinație funcțională foarte precisă, intervin așa numitele **„baterii de gene“** — un set de gene aflate într-un lincaj funcțional puternic care se exprimă concertant. Acest termen de **„baterie de gene“** a fost introdus în Genetică de către Th. H. Morgan, în anul 1934, și reluat ulterior de către Britten și Davidson (1969). Noțiunea semnifică setul de gene exprimate împreună, deoarece sistemele lor **cis**-reglatoare răspund la impulsuri **trans**-reglatoare comune. Un asemenea sistem de **„baterie de gene“** este prezentat în figura 4, în care apar elemente relevante cis-reglatoare din patru gene funcționale în celula musculară a amniotelor. Se poate constata cum mai multe tipuri de factori transcripționali, ce se leagă la ADN, sunt utilizate de asemenea sisteme reglatoare, **viz.** un factor bHLH cu specificitate musculară din familia MyoD (MDF); SRF (“**serum response factor**“) și factorul

MEF2 cu specificitate musculară. Astfel, principiul de bază al bateriei de gene lincate este acela al organizării unor gene lincate într-o baterie genică prin prezența unor situsuri țintă **cis**-reglatoare pentru seturi comune de reglatori ai transcripției. Acest principiu are la bază particularitățile de organizare structurală a genomului care fac ca anumite gene să intre în componența unor anumite baterii genice, deopotrivă în cursul dezvoltării organismului și al evoluției speciei. Factorii de transcripție activează elemente reglatoare ale bateriei genice. Uneori, factori singulari reprezintă declanșatorul prin care sunt activate gene ale diferențierii terminale. Uneori, mai mulți factori pozitivi diferiți pot acționa sinergic. Atunci când granițele spațiale în cadrul cărora vor fi exprimate funcțiile terminale au fost organizate în amonte, represorii delimitanți ai acestor granițe nici nu mai sunt necesari, astfel că unele elemente cis-reglatoare care funcționează în această situație sunt lipsite de orice situs țintă pentru represorii spațiali. Elementele cis-reglatoare terminale sunt adesea compacte, și dacă o genă este programată să funcționeze în mai multe tipuri celulare diferite, ele pot conține, în cadrul aceluiași modul, situsuri pentru diferiți activatori care sunt prezenți în aceste tipuri celulare. Mai mult încă, procesele de diferențiere terminală mediază adesea expresia la nivele foarte înalte, produșii genici pe care îi controlează fiind prezenți uneori în cantități enorme. Exemplul clasic este cel al genelor globinice din eritrocitele mamiferelor. În anumite stadii, aceste gene asigură în proporție de peste 90% sinteza de proteine a acestor celule (Hunt, 1974). Nivelele foarte înalte de transcripție implică faptul că trăsăturile particulare **cis**-reglatoare mediază ratele maxime de inițiere în aparatul bazal de transcripție care poate fi reglat deopotrivă cantitativ și calitativ.

Întreaga informație care asigură „logică" unei asemenea organizări a componentei reglatoare a unui genom este înscrisă în secvența de nucleotide a ADN.

Dacă trăsăturile morfologice ale unui animal reprezintă rezultatul procesului dezvoltării, iar procesul de dezvoltare al fiecărei ființe este controlat de către programul reglator genomic, atunci evoluția formei animalelor este consecința evoluției acestor programe de reglare genomică. Genomica reglatoare și genomica comparativă vor oferi astfel date esențiale în înțelegerea modului și ritmului evoluției biologice. Când vom afla în termeni funcționali care sunt componentele elementelor specifice de reglaj genomic care asigură diferențierea morfologică dintre două organisme care au un strămoș comun, atunci vom vedea exact care sunt diferențele cauzale esențiale din ADN al acestor organisme. Astfel, înțelegându-se cum funcționează aceste programe în domeniul dezvoltării ontogenetice și al evoluției, se va putea da o interpretare exactă mecanismelor evolutive fundamentale, puțin sau deloc înțelese, în prezent.

Diferențele în arhitectura rețelei reglatoare reprezintă cauza diversificării filogenetice.

CAPITOLUL XIV

GENELE HOMEOTICE LA ANIMALE

1. GENERALITĂȚI

Dezvoltarea unui organism este un proces complex în care sunt implicați numeroși factori aflați în interacțiuni multiple. Această rețea de interacțiuni are în vedere îndeplinirea programului genetic care dirijează etape ale dezvoltării, de la un număr redus de celule simple, pluripotente, până la organismul cu numeroase țesuturi și organe diferențiate.

În cadrul dezoltării normale a unui organism, perioada cea mai importantă pentru normalitatea viitorului individ este perioada embrio-fetală și, în primul rând, etapa dezvoltării embrionare, caracterizată prin numeroase diviziuni celulare și migrări de poziție ale celulelor.

Modelul (tiparul) embrionar reprezintă un ansamblu celular tridimensional caracteristic fiecărui organism. În cursul modelării embrionare, celulele sunt organizate spațial și temporal pentru a forma structuri înalt organizate. De exemplu, formarea modelului membrelor implică specificarea funcțională responsabilă de formarea tuturor tipurilor celulare caracteristice membrelor (celule musculare, cartilaginoase, osoase, conjunctive, etc.).

Formarea modelelor embrionare implică inițial definirea principalelor axe embrionare: antero-posterioare și dorso-ventrale. Ulterior, are loc distribuirea celulelor rezultate din segmentarea celor trei foițe embrionare. În etapa următoare, celulele capătă identități distincte și alcătuiesc modele spațiale de celule diferențiate.

La toate speciile, dezvoltarea zigotului se desfășoară în linii generale, după un model de bază care implică trecerea prin stadiile inițiale de morulă, blastulă și gastrulă.

Totalul diviziunilor celulare care au loc în zigot până la atingerea stadiului de gastrulă constituie **diviziunile de clivare**, iar celulele rezultate din aceste diviziuni se numesc **blastomere**. În felul acesta, sunt parcurse stadiile de morulă, blastulă, iar în stadiul de gastrulă se formează foițele embrionare: endodermul, ectodermul și mezodermul, declanșându-se procesul de segmentare.

Deși atât insectele, cât și vertebratele prezintă un proces de segmentare, cele două încrengături diferă semnificativ prin gradul în care segmentarea permite organizarea antero-posterioară a embrionului și prin baza celulară a segmentării. Insectele sunt segmentate în grad mare, iar mecanismele genetice de la baza metameriei lor sunt binecunoscute. Vertebratele, pe de altă parte, evidențiază o metamerie mai puțin completă și mai puțin înțeleasă, prezentându-se sub forma somitelor și rombomerelor creierului posterior.

2. GENELE DEZVOLTARII EMBRIONARE

La *Drosophila melanogaster* s-a stabilit că dezvoltarea embrionară este dirijată de două clase de gene:

1. gene necesare stabilirii segmentelor embrionare
a) gene coordonatoare maternale
b) gene zigotice
2. gene implicate în stabilirea identității segmentelor embrionare — genele selectoare homeotice.

1. Gene necesare stabilirii segmentelor embrionare

a) Genele materne

Sunt gene exprimate de către mamă în celulele granuloasei, în timpul ovogenezei, deci înainte de fecundare. Transcripte și polipeptide simple sintetizate de genele materne specifice trec din celulele granuloasei în citoplasma ovocitei, unde se acumulează. Aceste produse de informare genetică maternă se moștenesc de către zigoți la fecundare, si ribozomii utilizați pentru sintezele protenice din prima parte a dezvoltării embrionare sunt transmiși de ovocită și nici un ribozom nu este sintetizat „de novo" până la stadiul de gastrulă. În momentul fecundării, ovocita secundară este echipată cu informația genetică și capacitatea de sinteze proteice necesare derulării primelor stadii de dezvoltare embrionară.

Principalul rol al genelor materne este acela de a asigura, prin produșii săi informaționali transmiși zigotului, realizarea polarizării acestuia, adică zigotul trebuie să dobândească un ax antero-posterior.

Genele materne acționează în regiuni mari ale embrionului: regiunea anterioară, regiunea posterioară și regiunea dorso-ventrală.

Genele materne au fost descoperite pe baza analizei fenotipurilor mutante ale embrionilor proveniți din ovocitele femelelor normale din punct de vedere fenotipic, dar purtătoare ale unor mutații care determinau producerea de ovocite anormale.

În funcție de regiunile embrionare pe care le afectează, aceste mutații au fost împărțite în trei clase:

– Mutații ale genelor din grupul anterior (*bicoid*) determină reducerea sau pierderea capului și a structurilor toracice, sau în unele cazuri, înlocuirea lor cu structuri posterioare.

– Mutațiile grupului posterior (*nanos*) sunt caracterizate de pierderea regiunilor abdominale și formarea de embrioni mai mici.

– Mutațiile grupului terminal (*torso*) afectează structurile specializate de tipul acronului și telsonului.

GRUPUL A (ANTERIOR)

bicoid (bcd); *exuperantia* (exu); *swallow* (swa)

Gena cheie în acest grup este *bicoid*. După fecundare ARNm bicoid este tradus, produsul proteic difuzând din capătul anterior spre regiunea mijlocie a embrionului, pentru a forma un gradient de concentrație de-a lungul axei A-P. Gradientul furnizează o informație de poziție necesară pentru modelarea embrionară ulterioară. Bicoid este un factor transcripțional care acționează ca un morfogen și determină inițierea unui anumit model de exprimare a genelor zigotice — *hunchback* și *orthodendicle*. În regiunea anterioară a embrionului bicoid activează gena zigotică *hunchback* prin legarea de 6 secvențe localizate în regiunea promotor.

GRUPUL P (POSTERIOR)

nanos (nos); *tudor* (tud); *oskar* (osk); *vasa* (vas); *valois* (val)

Mutațiile acestor gene determină formarea de larve în care dezvoltarea abdominală este anormală. Similar ARNm bicoid, ARNm nanos este tradus după fecundare, pentru a forma un gradient proteinic, care are valoare maximă la capătul posterior al embrionului.

Spre deosebire de bicoid, nanos nu acționează direct ca un morfogen pentru a specifica modelul abdominal. Funcția proteinei nanos este aceea de a bloca într-o manieră gradată, traducerea ARNm maternal *hunchback* , distribuit uniform în zigot. Blocarea este necesară pentru a stabili un gradient A-P clar al proteinei *hunchback* zigotice, în regiunea posterioară.

GRUPUL T (TERMINAL)

Este responsabil de specificarea structurilor aflate la extremitățile embrionului de tipul acronului, telsonului și a segmentelor abdominale posterioare.

torso (tor); *trunk* (trk); *fs 1 Nasrat; fs 1 (pole hole); ras 1; son of sevenless; forkhead; tailles*

Gena cheie în acest grup este *torso*. Mutația *torso*, în care embrionul este lipsit de acron și telson, indică faptul că cele două regiuni terminale ale embrionului, deși separate topografic, nu sunt specificate independent. Formarea structurilor terminale se realizează printr-un mecanism diferit de cel al structurilor anterioare și posterioare și implică activarea celor 2 poli ai embrionului, a unui receptor Tyr-kinazic, codificat de gena maternală *torso*. Deși acest receptor este distribuit uniform în membrana plasmatică a oului, el este activat doar la extremitățile embrionului, de către ligandul prezent la acest nivel. În timpul ovogenezei, ligandul este ancorat în anvelopa vitelină de la cele două capete ale ovocitului. Odată cu începerea dezvoltării embrionare, ligandul este eliberat în spațiul previtelin, unde interacționează cu receptorul torso. Interacția receptor-ligand activează calea de semnalizare a receptorului Tyr-kinazic care conduce la exprimarea genelor zigotice terminale de tipul *tailless*.

3. ORGANIZAREA AXEI DORSO-VENTRALE

Axa dorso-ventrală este specificată de un set de gene maternale separate de cele implicate în formarea axei antero-posterioare, dar care sunt transcrise, de asemenea, în ovar.

În stadiul 7-8 al ovogenezei, nucleul migrează prin intermediul microtubulilor din polul posterior la marginea anterioară a ovocitului. În acest moment, se exprimă gena *gürken* și produsul ei protenic difuzează în spațiul previtelin din regiunea dorsală. Datorită faptului că ligandul *Gürken* poate difuza doar pe o distanță scurtă el este recepționat de celulele foliculare situate deasupra nucleului, în membrana cărora există un receptor Tyr-kinazic numit *Torpedo*.

Interacția între *Gürken* și *Torpedo* (genă denumită după aspectul ouălelor mutante) activează calea de semnalizare a receptorului Tyr-kinazic, necesară ca aceste celule să adopte un destin dorsal (devin mai înalte decât celulele foliculare ventrale). În plus, adoptarea acestui destin dorsal inhibă exprimarea în celulele foliculare a genelor *windbeutel* și *pipe*.

Viitoarea regiune ventrală a embrionului depinde de localizarea în anvelopa vitelină și spațiul previtelin a mai·multor molecule maternale, implicate într-o cascadă proteolitică, care culminează cu translocarea în nucleii ventrali a proteinei *Dorsal*.

W*indbeutel* poate funcționa ca o proteina „chaperone", cu rol în împachetarea unui factor secretat, ce furnizează o informație de poziție embrionului.

Gena *pipe* codifică o proteină implicată în sulfatarea GAG (glicozaminoglicanilor). Exprimarea genei *pipe* în celulele foliculare ventrale este probabil responsabilă de formarea unui GAG necesar asamblării unui complex multiproteinic activator sau pentru activarea uneia din serin proteazele din lichidul previtelin.

Alte gene implicate in stabilirea axei dorso-ventrale.

nudel; gastrulation defective; snake; easter

Spätzle este produsul genic care reprezintă ligandul pentru receptorul Toll.

Formele active ale proteinelor *Nudel, Gastrulation defective, Snake, Easter* și *Spätzle* sunt generate prin clivaj proteolitic.

Toll numele genei reflectă entuziasmul cercetătorului în momentul descoperirii ei. Toll înseamnă în limba germană, mare, extraordinar și el este un receptor transmembranar distribuit pe toată suprafața embrionului. El conține un domeniu extracelular mare, în care se găsesc mai multe repetiții bogate în leucină, un domeniu transmembranar și un domeniu citoplasmatic.

Activarea receptorului Toll are loc în stadiul de blastoderm sincițial și inițiază o cale de semnalizare ce culminează cu translocarea în nucleii de pe partea ventrală a proteinei Dorsal.

Proteina Dorsal este un factor transcripțional, determină formarea de mezoderm, ectoderm ventral (viitorul neuroectoderm), ectoderm dorsal (viitoarea epidermă dorsală) și a amnioseroasei (înveliș extraembrionar localizat pe fața dorsală a embrionului care este îndepărtat la sfârșitul dezvoltării embrionare).

Genele *decapentaplegic, tolloid* și *zerknüllt* sunt represate de proteina Dorsal și astfel, activitatea lor este restrânsă la regiunile cele mai dorsale ale embrionului, unde proteina Dorsal rămâne în citoplasmă. *Zerknüllt* este exprimată în regiunea cea mai dorsală și specifică, amnioseroasa, în timp ce d*ecapentaplegic* este o genă cheie în modelarea dorsală a embrionului.

Gena zigotică *zerknüllt* este diferită de celelalte gene implicate în formarea axei dorso-ventrale. Ea face parte din grupul de gene selectoare homeotice, dar, spre deosebire de acestea, este exprimată o scurtă perioadă de timp (2 — 4 ore, după fecundare). Ea nu participă la metamerizarea embrionului. Acest comportament este susținut de o organizare complexă a regiunii promotor în care s-au identificat secvențe distale, care mediază răspunsul inițial la factorii maternali și secvențe proximale, responsabile de modelarea embrionară. Elementele reglatorii distale au proprietatea unui *„silencer"* (sau *anti-"enhancer"*) și pot acționa pe distanțe lungi pentru a inhiba exprimarea ventrală a promotorului heterolog. În regiunile distale există situsuri de legare a proteinei Dorsal. În acest caz, Dorsal este convertită într-un factor transcripțional inhibitor, de către o ptoteină tip HMG. Convertirea depinde de existența unei secvențe numită **E**lement **R**eglator **V**entral (ERV) localizat în apropierea situsurilor de legare a proteinei Dorsal, din regiunea promotor a genei *zerknüllt.* Secvențele proximale interacționează cu factori care pot fi modulați prin comunicare intercelulară.

Gene zigotice

Acestea pot fi împărțite în trei categorii și anume: genele domeniilor nerepetitive; genele perechi; genele polarității segmentelor.

Genele domeniilor nerepetitive sunt primele gene zigotice exprimate de-a lungul axei antero-posterioare și codifică factori transcripționali. Proteinele din acest grup au o durată limitată de viață (minute) și se deplasează pe distanțe scurte.

După exprimarea genelor domeniilor repetitive axa antero-posterioară este împărțită în regiuni distincte. Acest mecanism de regionalizare poate funcționa doar într-un embrion acelular, în care factorii trasncripționali pot difuza. Produșii genelor domeniilor nerepetitive condiționează următorul stadiu al dezvoltării embrionare, în care are loc activarea genelor perechi și începutul metamerizării.

Genele embrionare perechi

O etapă critică a determinării segmentelor periodice în embrionul de *Drosophila* este transformarea informației de poziție aperiodice, codificată de genele maternale și cele ale domeniilor perechi. Această etapă este urmată de interacții între membrii genelor perechi.

Odată delimitat, fiecare parasegment se comportă ca o unitate embrionară independentă, aflată sub controlul genelor perechi. Parasegmentele sunt inițial asemănătoare, însă, ulterior, fiecare va căpăta propria identitate.

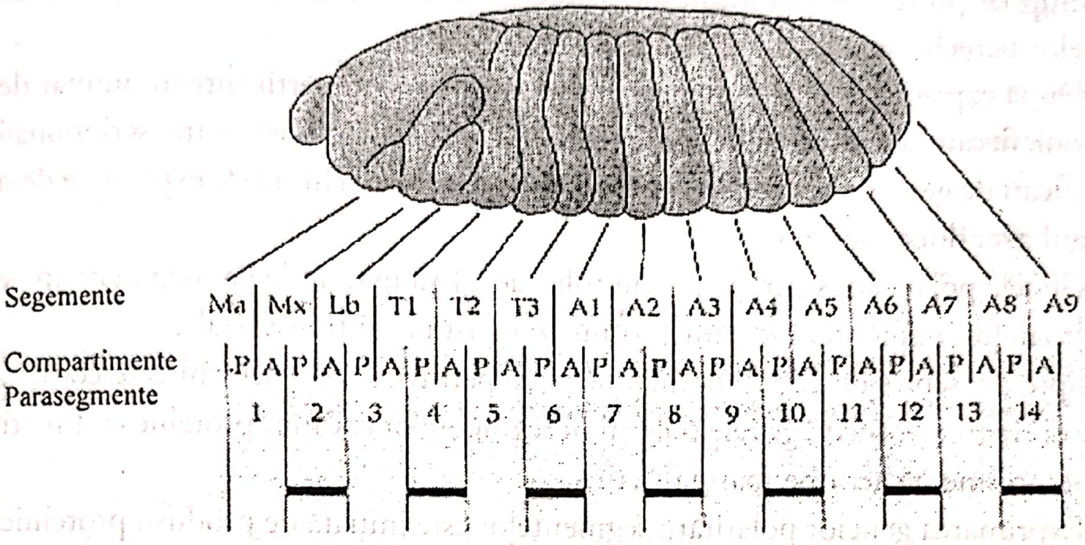


Fig 1 — Reprezentarea segmentelor și a parasegmentelor. A și P reprezintă compartimentele anterior și posterior ale segmentelor. Ma, Mx și Lb reprezintă trei segmente ale capului: mandibular, maxilar și labial, T denumează segmentele toracice, iar A segmentele abdominale. (după Martinez-Arias și Lawrence, 1985)

Mutațiile genelor perechi induc alterări în toate, sau o parte a parasegmentelor alternative, lăsând larva cu jumătate din segmentele normale. Acestea se exprimă înaintea stadiului de blastoderm celular, numai într-o parte a fiecărui parasegment. Din acest motiv, atunci când transcriptele codificate de aceste gene sunt detectate prin hibridizare „in situ“, embrionul are aspect de zebră.

Genele perechi se exprimă sub forma a 7 benzi transversale, fiecare bandă fiind formată din câteva rânduri de nuclei.

În cazul unor gene ca *even-skipped*, marginea anterioară a benzilor corespunde cu marginea anterioară a unui parasegment, în timp ce domeniile de exprimare ale altor gene perechi depășesc marginile parasegmentelor.

Exprimarea bandată a genelor perechi este condiționată de prezența produșilor genelor domeniilor nerepetitive.

Genele polarității segmentelor

Aceste gene încep să fie trascrise între stadiul de blastoderm celular și gastrulă, mutațiile lor îndepărtând părți din parasegmente și înlocuindu-le cu o duplicare a părții rămase din respectivul parasegment sau din cel adiacent.

S-a demonstrat existența unei ierarhii de exprimare a genelor perechi. Genele perechi primare sunt activate direct cu produșii genelor domeniilor nerepetitive, în timp ce proteinele codificate de aceste gene inițiale controlează exprimarea genelor perechi secundare.

După exprimarea genelor perechi, embrionul este împărțit într-un număr de regiuni, fiecare caracterizată de existența unor combinații de factori transcripționali codificați de genele domeniilor nerepetitive, genele perechi și cele exprimate de-a lungul axei dorso-ventrale.

Genele polarității segmentelor au rolul de a fixa marginile parasegmentelor și a viitoarelor segmente. Ele sunt exprimate în 14 benzi transversale.

Spre deosebire de genele domeniilor nerepetitive și cele perechi care codifică factori transcripționali, genele polarității segmentelor codifică proteine cu funcții și mecanisme de acțiune foarte diferite.

Exprimarea genelor polarității segmentelor este inițiată de produșii proteinici ai genelor perechi.

2. Gene implicate în stabilirea identității segmentelor embrionare. Genele selectoare homeotice.

După formare, segmentele primesc o identitate specifică dependentă de poziția lor de-a lungul axei antero-posterioare. Mutațiile genelor homeotice determină fenotipuri bizare, în care o parte a corpului este înlocuită cu alta.

Genele homeotice reprezintă a 3-a clasă de gene care acționează în perioada embrionară, începându-și activitatea la sfârșitul stadiului de gastrulă, în regiunile cele mai posterioare ale ectodermului și mezodermului, pe terenul pregătit de genele de segmentare.

Genele homeotice asigură, prin informația conținută, o dezvoltare embrionară normală la cele mai diferite organisme, începând de la ariciul de mare și până la om. Aceste gene se numesc și selectoare, pentru că destinul unui segment este selectat prin exprimarea unor gene homeotice specifice. Acestea constituie o clasă de gene principale care au fost prima dată studiate la *Drosophila melanogaster*, constatându-se că se caracterizează printr-o secvență de nucleotide comună, aproximativ 183 perechi de baze, localizată într-un singur exon. Această secvență sau motiv secvențial nucleotidic comun pentru toate genele care compun familia, a fost numită ***homeobox (cutie homeo-)***. De aici terminologia acestor gene de ***gene homeotice***, ***homeobox***, sau prescurtat **HOX**. Homeoboxul caracterizează nu numai genele homeotice propriu-zise, dar și o parte din genele segmentare.

În embrionul de *Drosophila* există celule larvare prezumtive și celule imaginale. Celulele larvare prezumtive se diferențiază timpuriu, formând țesuturile și organele larvare, iar celulele imaginale își întârzie diferențierea, până la metamorfoză. Există două tipuri de celule imaginale, care se invaginează din ectodermul embrionar: cuiburile histoblastice abdominale și 19 discuri imaginale.

Următoarele experimente au urmărit să determine dacă destinul unui disc imaginal este stabilit ireversibil. Stabilitatea determinării discurilor imaginale a fost testată prin introducerea într-o larvă în stadiul 3 a unui disc care a fost transplantat seriat. Dacă se obține aceiași structură adultă după mai multe cicluri de creștere și diviziune se poate concluziona că determinarea a fost ireversibilă. Dacă se obțin structuri diferite, înseamnă că discurile imaginale pot fi comutate de pe destinele lor embrionare originare.

Destinul unui disc imaginal odată stabilit în embriogeneză este, în mod normal, stabil. În anumite cazuri, poate avea loc o modificare a destinului celular originar, numită ***transdeterminare***.

Deși, la prima vedere toate discurile imaginale arată asemănător, ele se diferențiază în acord cu segmentul în care sunt localizate.

La *Drosophila melanogaster* toate genele HOX sunt grupate în tandem pe brațul lung al cromozomului 3, alcătuind două complexe genice: *Antennapedia* (ANT-C) și *Bithorax* (BX-C).

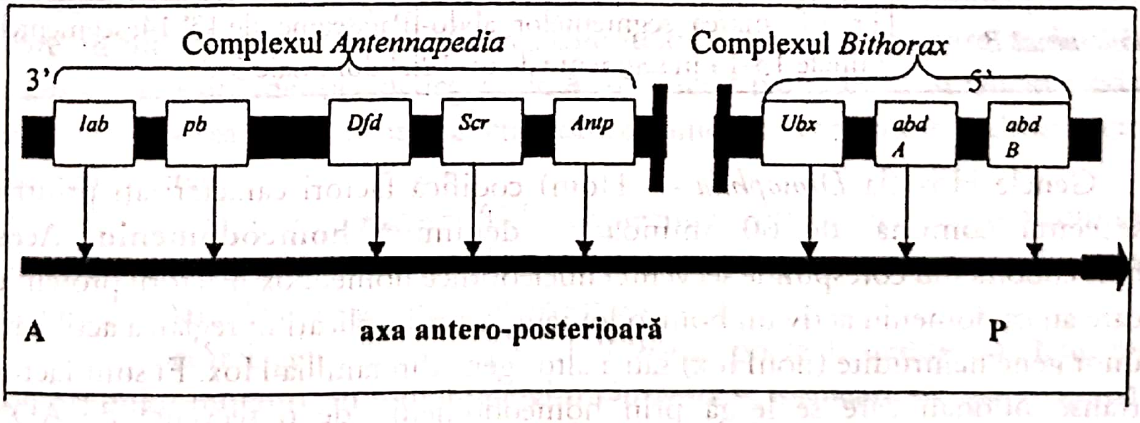


Fig. 2 — Organizarea complexului HOM la *Drosophila.* Săgețile indică domeniile de exprimare de-a lungul axei antero-posterioare (adaptată după M.P. Scott, 1992).

Tabel nr. 1 Genele homeotice ce alcătuiesc cele două complexe genice la *Drosophila melanogaster*

Denumirea	Fenotipul mutant	Domeniul de exprimare
Complexul *Antennapedia*		
labial	Transformarea labiului	Segmentele capului
proboscipedia	Transformarea unei parti a gurii în picior	Regiunea anterioară a aparatului bucal
deformed	Modificări în dimensiunea ochilor și a structurilor cuticulare de pe cap și torace	Parasegmentul 1
sex combs reduced	Reducerea unor apendici	Parasegmentele 2 și 3
Antennapedia	Transformarea unor apendici în picioare	Parasegmentele 2, 3 și 4
Complexul *Bithorax*		
Ultrabithorax	Halterele sunt înlocuite cu o pereche suplimentară de aripi	Parasegmentele 5-13; regiunea posterioară a celui de-al doilea segment toracic și regiunea anterioară a primului segment toracic
abdominal A	Transformarea segmentelor abdominale 7-12 în șase segmente abdominale tip 6	Parasegmentele 7-13; regiunea posterioară a primului segment abdominal, segmentele abdominale 2 ,3 ,4.
abdominal B	Transformarea segmentelor abdominale 13-14 în segmente de tip 12	Parasegmentle 13, 14; segmentele abdominale 5-8

Genele Hox (la *Drosophila* — Hom) codifică factori caracterizați printr-o secvență comună, de 60 aminoacizi, denumită **homeodomeniu.** Acest homeodomeniu corespunde secvenței nucleotidice homeobox. Factorii proteinici care au ca domeniu activ un homeodomeniu sunt implicați în reglarea activității unor gene neînrudite (nonHox) sau a altor gene din familia Hox. Ei sunt factori transcripționali care se leagă prin homeodomeniu de o secvență de ADN complementară țintă. Secvențele de ADN țintă, recunoscute de homeodomeniul factorilor proteinici de reglare sunt reprezentate, de obicei, de un grup de 10-12 perechi de baze situate in jurul unui motiv central: TAAT.

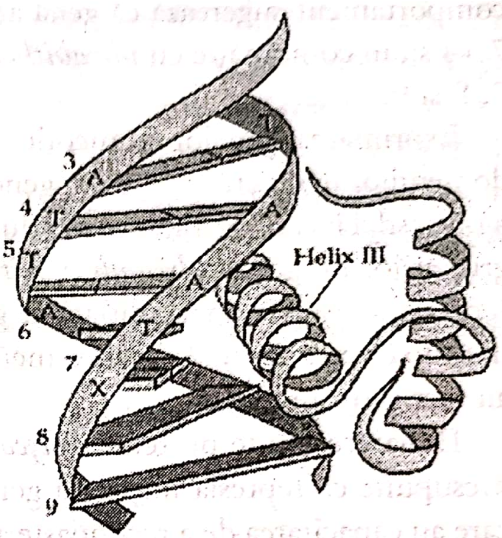


Fig. 3. — Interacții ADN-homeodomeniu. Figura reprezintă homeodomeniul helix-turn-helix situat în adâncitura majoră a ADN.(după Riddihough, 1992).

Homeodomeniul, codificat de o sevență de ADN numită homeobox este alcătuit din aproximativ 60 de aminoacizi, care formează 3 α-helixuri împachetate într-o structură globulară. Helixul 1 este precedat de un braț flexibil N-terminal și separat printr-o buclă flexibilă de helixul 2. Helixurile 1 și 2 sunt antiparalele și perpendiculare pe al treilea.

Homeodomeniul *Antennapedia,* cel mai cunoscut, conține 68 de aminoacizi și se fixează de un fragment de ADN de 14 Kb. Helixul de recunoaștere este așezat în curbura majoră a acidului nucleic și aminoacizii bazici interacționează cu grupările fosfat, din ambele catene ale ADN, într-un mod alternativ. Datorită orientării perpendiculare a helixului de recunoaștere pe ADN, interacțiile alternative oferă cel mai eficient mod de stabilizare a complexului ADN-proteine. Capătul N-terminal al homeodomeniului se înfășoară în jurul ADN și contactează adâncitura minoră de pe fața opusă, prin intermediul a două arginine. Acest aspect demonstrează că specificitatea funcțională a homeodomeniului nu este dată exclusiv de helixul de recunoaștere, ci și de braxul flexibil, N-terminal.

Secvențele recunoscute de homeodomenii sunt prea scurte (4-6 pb) și destul de comune pentru a asigura o specificitate biologică. În plus, homeoproteinele care au un rol crucial în specificarea diferitelor destine embrionare au în unele cazuri preferințe identice de legare de ADN. Acest paradox a fost elucidat odată cu descoperirea altor proteine cu homeodomeniu, care au rol de cofactori transcripționali.

Complexele *Antennapedia* și *Bithorax* prezintă o organizare genetică comună, în care ordinea genelor din complex reflectă ordinea spațială și temporală în care sunt exprimate de-a lungul axei antero-posterioare.

Rolul fiecărei gene din complexul *Bithorax* poate fi dedus din fenotipul embrionilor mutanți. În mutantele U*ltrabithorax* se formează trei parasegmente de tip 4 și lipsesc parasegmentele 5 și 6. Dacă este activă numai gena *ultrabithorax*, larva are segmentele 4, 5 și opt segmente tip 6. În mutantele *Abdominal A* se formează șapte parasegmente tip 6 și parasegmentele 13 și 14. Dacă se exprimă doar genele U*ltrabithorax* și *abdominal A* , larvele au parasegmentele 4-9. Acest comportament sugerează că gena *abdominal A* are efect asupra parasegmentelor 7-14 și, în combinație cu *ultrabithorax*, poate specifica destinul parasegmentelor 7, 8 și 9.

Exprimarea genelor homeotice este controlată inițial de produșii genelor domeniilor nerepetitive și cei ai genelor perechi. Aceștia dispar după aproximativ 4 ore, astfel încât , exprimarea continuă și corectă a genelor HOM necesită acțiunea grupurilor de gene *polycomb* și *trithorax*. Proteinele grupului *Polycomb* asigură represia transcripțională inițiată de genele domeniilor nerepetitive și cele perechi, în timp ce proteinele *Trithorax*, mențin exprimarea genelor, în acele celule în care au fost activate inițial.

Deoarece multe proteine *Polycomb* sunt incapabile de a se lega de ADN, se presupune că represia inițială a genelor este realizată de factori transcripționali care au capacitatea de a recunoaște acidul nucleic, în timp ce proteinele *Polycomb* se asamblează la situsul represiei inițiale și formează un complex multiproteinic implicat în modificarea cromatinei și inactivarea genelor. Din acest motiv, multiplele roluri ale proteinelor *Polycomb* sunt realizate nu prin legarea de ADN, ci prin asocierea cu alte proteine cromozomale, în special histone, sau prin autoasociere (Van Lohuizen, 1998; 1999).

Într-o serie de gene au fost identificate fragmente de ADN de câteva sute de pb, recunoscute de *Polycomb*. Acestea poartă denumirea de elemente de răspuns *Polycomb* (PRE[186]). De exemplu, în gena *ultrabithorax* există două astfel de elemente, unul localizat la 25 Kb, după situsul start și altul la 30 Kb, înaintea acestui situs. Complexele *Polycomb* formate la nivelul elementelor de răspuns sunt aduse în vecinătatea regiunilor enhancer și promotor, pe care le afectează pe o distanță de 20 — 30 Kb.

Din grupul *Trithorax* au fost identificate 20 de gene care funcționează ca activatori transcripționali și mențin activitatea genelor homeotice în acele segmente în care au fost activate inițial.

Dovezi experimentale recente, provenite din studiile de transgeneză și *knock-out* au indicat că reglajul genetic realizat de proteinele remodelatoare ale cromatinei este necesar și la adult, nu numai în cursul dezvoltării embrionare, pentru exprimarea corectă a genelor HOX. Hiperexprimarea grupului *Polycomb* și a grupului *Trithorax* este observată frecvent, în special în leucemii, în timp ce blocarea genelor mediată de grupul *Polycomb* a fost implicată direct în anumite aspecte ale controlului ciclului celular și senescenței (Lyko și Paro, 1999).

Genele homeotice interacționează unele cu altele și analizele gentice au arătat că genele care se exprimă în domeniile posterioare funcționează ca reglatori negativi ai genelor transcrise în regiunile anterioare.

Acest fenomen poartă denumirea de **dominanță posterioară**.

Genele homeotice sunt implicate în conferirea unei identități pentru fiecare segment, însă numărul acestora este mai mic decât numărul parasegmentelor pe care le controlează. De exemplu, complexul *Bithorax* conține trei gene și este responsabil de diferențierea a 10 parasegmente. În plus, exită mutații care alterează morfologia antero-posterioară a unui parasegment sau chiar a unei singure regiuni din parasegment. Multe din aceste mutații au fost identificate în regiunile de control, necodificatoare ale genelor și sunt atașate de-a lungul cromozomului într-o secvență care respectă ordinea anatomică a segmentelor pe care le afectează. Acest aspect sugerează că diferențele dintre regiunile corporale nu sunt definite numai de prezența produșilor genelor homeotice, un rol important revenind regiunilor de control asociate acestor gene.

4. GENELE HOX LA *CAENORABDITIS ELEGANS*

Deși, planul corporal al nematodelor este foarte diferit de cel al insectelor și vertebratelor, în primul rând, prin absența segmentării antero-posterioare, la acești viermi au fost identificate gene care conțin homeobox și sunt implicate în specificarea destinului celular de-a lungul acestei axe.

Grupul HOX conține cinci gene (fig. 4) cu orientări transcripționale diferite (*ceh-23, egl-5, mab-5, ceh-13* și *lin-39*)

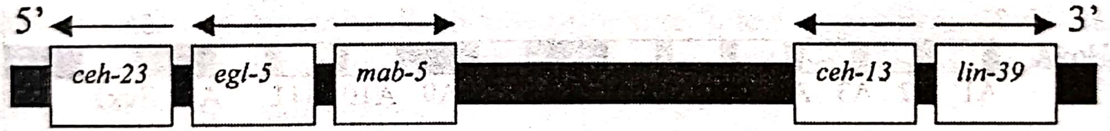


Fig. 4. — Grupul HOX la *Caenorabditis elegans.*

Mutațiile genelor homeotice de la *Caenorabditis elegans* pot determina celulele dintr-o anumită regiune a corpului să adopte destinul altei regiuni. De exemplu, în mutația *lin-39* celulele din regiune mijlocie a larvei adoptă destinul caracteristic regiunilor anterioare sau posterioare.

În ciuda faptului că exprimarea genelor HOX la nematode are loc într-un model regional, aceasta nu este dependentă de poziția embrionară. De exemplu, în larvă, celulele care exprimă gena *mab-5* sunt organizate în aceiași regiune, deși ele au origini diferite. În ciuda aparențelor, activarea *mab-5* este determinată autonom și independent în fiecare descendență celulară și nu depinde de semnale extracelulare. Unele celule care vor exprima *mab-5* migrează în cursul dezvoltării la destinația finală. Dacă migrarea este blocată, celulele exprimă *mab-5*, dar într-o regiune ectopică.

Ordinea proceselor embrionare este un aspect foarte important, pentru că genele trebuie să fie exprimate la locul și momentul corespunzător. Unul din cele mai bine studiate exemple de sincronizare embrionară la nematode se bazează pe generarea de modele diferite de diviziuni și diferențieri celulare, în cele patru stadii larvare.

Genele HOX la vertebrate

Spre deosebire de *Drosophila melanogaster*, la majoritatea vertebratelor, genele HOX sunt aranjate în 4 grupe, fiecare grupă de gene fiind localizată pe câte un cromozom diferit.

Astfel, la șoarece, cele 50 gene homeotice sunt grupate în 4 loci complecși: HoxA, în cromozomul 6, HoxB, în cromozomul 11, HoxC, în cromozomul 15 și HoxD, în cromozomul 2, dar și sub formă de gene izolate, în alți cromozomi: cromozomul 5, cromozomul 1, cromozomul 17, cromozomul 18.

Un locus complex care conține o familie de gene Hox poate fi alcătuit din 20-100 kb, adică 8-13.

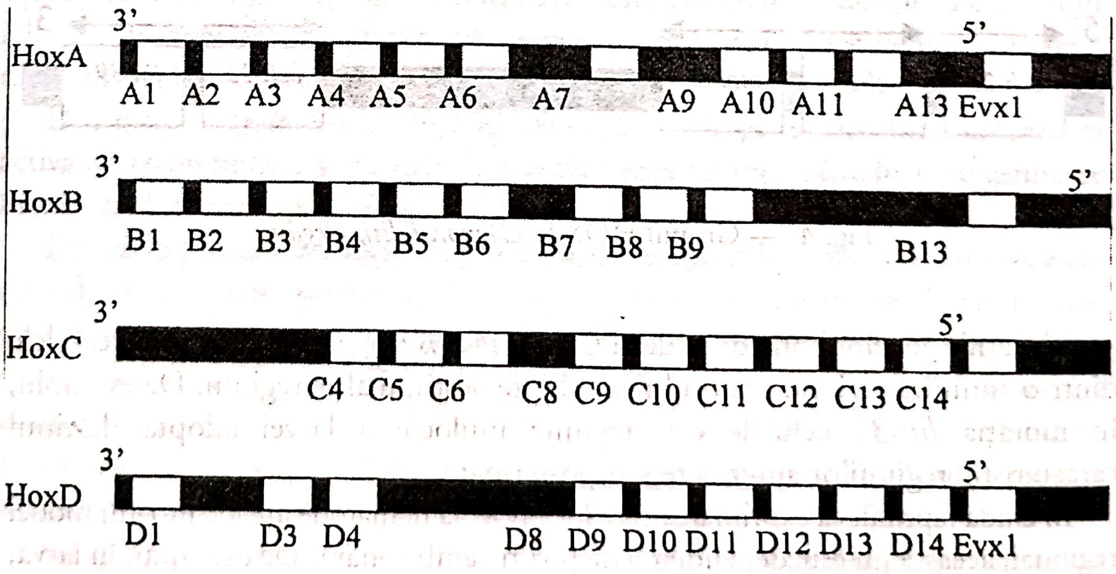

3'
5'
HoxA
A1
A2
A3
A4
A5
A6
A7
A9
A10
A11
A13
Evx1
3'
5'
HoxB
B1
B2
B3
B4
B5
B6
B7
B8
B9
B13
3'
5'
HoxC
C4
C5
C6
C8
C9
C10
C11
C12
C13
C14
3'
5'
HoxD
D1
D3
D4
D8
D9
D10
D11
D12
D13
D14
Evx1

Fig 5 — Schiță generală privind organizarea genelor HOX la vertebrate (adaptată după M.P. Scott, 1992).

Toate genele dintr-un grup sunt transcrise în aceeași direcție: 5'-3'. Cu cât o genă dintr-un grup este mai aproape de capătul 5', cu atât domeniul său embrionar de exprimare este mai posterior, astfel încât, genele situate spre extremitatea 5' sunt, adeseori, denumite gene posterioare, iar genele situate spre capătul 3' al grupului sunt denumite gene anterioare.

Genele care prezintă cea mai mare asemănare până la identitate, în privința secvenței lor homeobox, sunt grupate in 13 subfamilii sau **grupe paraloage** (de exemplu, grupa paralogă 1 cuprinde genele HoxA1,B1 și D1; grupa paralogă 9 cuprinde genele HoxA9, B9,D9).

Funcțiile genelor Hox rezultă din observarea efectelor mutațiilor lor. Anomaliile de dezvoltare observate sunt dramatice.

Heterozigoții pentru o mutație Hox sunt normali, dar dacă mutația este în stare homozigotă, ea este letală. Astfel, în cazul genelor homeotice, o singură doză a unei gene normale este capabilă de a susține un program normal de diferențiere și că alela mutată nu funcționează ca o mutație dominantă negativă.

O altă caracteristică a mutațiilor Hox este lipsa de specificitate a locului de exprimare a genei. Dacă gena HoxD4, o genă homeotică care normal se exprimă la nivelul vertebrelor cervicale, este determinată prin inginerie genetică să se exprime în osul occipital acesta se dezvoltă cu caracteristicile vertebrelor cervicale. Deci, gena HoxD4 este capabilă să schimbe programul de diferențiere când se exprimă într-un loc alternativ.

S-a stabilit că, la vertebrate, exprimarea genelor Hox este evidentă în țesuturile mezodermice, ectodermice și endodermice care suferă o proliferare celulară extensivă, migrare, mixare și semnalizare intercelulară, evenimente care sunt asociate cu gastrularea și organogeneza.

Dacă la *Drosophila melanogaster* există un grup aparte de gene care controlează segmentarea embrionară, la mamifere, o parte din genele homeotice servesc ca gene de segmentare.

Ordinea genelor în cadrul grupelor HOX reflectă ordinea în care ele se exprimă pe axul antero-posterior al embrionului, realizându-se așa numitul fenomen de **colinearitate**. Colinearitatea spațială a fost demonstrată în cazul exprimării genelor HOX, la nivelul creierului posterior. Analiza exprimării genelor HOX din extremitatea 3' a grupului HoxB, în creierul posterior, a demonstrat că modelul de exprimare a patru gene, coincide cu marginile anumitor rombomere. Colinearitatea temporală este ilustrată, de exemplu, de faptul că transcriptul genei HoxD13 apare numai după formarea transcriptului HoxD10. Acest comportament indică faptul că niciodată nu va fi detectat un transcript al unei gene Hox înaintea formării transcriptului genei vecine, dinspre capătul 3'.

Genele HoxA 10, HoxA 11, HoxA 13 specifică axa proximal-distală, în timp ce genele HoxD11, HoxD12 și HoxD13 sunt implicate în regionalizarea axei antero-posterioare a mugurelui membranar. În cazul regionalizării proximal-distale, gena HoxA10 se exprimă în regiunea unde se va forma humerusul (sau femurul în membrul posterior), genele HoxA10-11, în cea în care se va forma radius și ulna (sau tibia și fibula), în timp ce domeniul care va forma încheietura membrului și degetele exprimă genele HoxA10-13.

Implicarea genelor Hox în dezvoltarea membrelor umane este demonstrată de mutația genei HoxD13, care determină polidactilia și fuziunea degetelor, în timp ce mutația HoxA13 conduce la micșorarea degetelor anterioare și posterioare.

Deși importanța biologică a colinearității pentru dezvoltarea vertebratelor este evidentă, mecanismele activării transcripției progresive a genelor sunt încă necunoscute. Legătura dintre organizarea grupată a genelor Hox la vertebrate și transcrierea lor coordonată în spațiu și timp a fost explicată de către Duboule (1998) pe baza a cinci tipuri de interacții reglatorii.

1. Regiuni enhancer comune — un enhancer poate influența pozitiv sau negativ activitatea a două gene vecine. Aceste secvențe reglatorii sunt necesare pentru întârzierea transcrierii genelor care se exprimă în regiunile posterioare. Mecanismul regiunilor enhancer comune sugerează că la vertebrate, spre deosebire de *Drosophila* nu sunt frecvente elementele insulatoare care să izoleze unitățile transcripționale unele de altele;

2. Selectivitatea interacțiilor dintre promotor și enhancer — mecanism responsabil de exprimarea genelor în domenii distincte. S-a constatat că regiunea enhancer localizată între genele HoxB4 și HoxB5 poate funcționa în ambele direcții, când este combinată cu regiunea promotor a genei HoxB4 și incapabilă de un comportament similar, atunci când este combinată cu promotorul HoxB5. Astfel, deși aceste două regiuni promotor împart un enhancer, există secvențe suplimentare folosite doar de un promotor;

3. Competiția dintre regiunile promotor. Același enhancer poate lucra eficient, dar separat, cu două regiuni promotor. În cazul unei configurații genice în care sunt prezente ambele regiuni promotor, regiunea enhancer prezintă preferință numai pentru una. Dacă distanța dintre regiunile promotor este mai mare sau sunt adăugate alte elemente între ele, se poate reinstala activitatea celui de al doilea promotor;

4. Regiunile enhancer globale pot controla exprimarea mai multor gene cu aceeași specificitate;

5. Accesibilitatea enhancer-promotor. În acest caz, complexele Hox pot trece de la o conformație închisă (asociată cu foarte multe proteine) la una deschisă. În momentul când conformația este deschisă, un enhancer devine accesibil și poate interacționa cu una din genele vecine. Această stare deschisă se poate propaga de-a lungul complexelor, astfel încât, genele pot fi afectate progresiv de respectiva regiune enhancer.

Un alt aspect important al genelor Hox este cel al **dominanței posterioare**, caracterizat de faptul că, în general, inactivarea anumitor gene Hox determină efecte fenotipice limitate la regiunile anterioare ale domeniului de exprimare.

Redundanța genetică este o altă proprietate a grupurilor Hox. Cu excepția unor gene localizate în extremitatea 3' a grupurilor, mutațiile majorității genelor Hox determină fenotipuri minore, care nu alterează profund morfologia embrionului.

Acidul retinoic, steroid embrionar, dar și agent teratogen, poate modifica exprimarea genelor Hox când este administrat în timpul somitogenezei. Acidul retinoic afectează identitatea regională a crestelor neurale din creierul posterior. Tratarea embrionilor de șobolan cu acid retinoic, în a noua zi după fecundare, determină modificări ale formei și mărimii primului arc branhial și fuziunea primului cu cel de-al doilea arc branhial.

Experimentele au arătat că tratarea embrionilor timpurii cu acid retinoic induce migrarea ectopică a celulelor crestelor neurale, care se distribuie în al doilea arc branhial. În plus, acidul retinoic blochează proliferarea și migrarea celulelor crestelor neurale (Gudas, 1994).

La mamifere, acidul retinoic afectează exprimarea genelor din grupul HoxB într-o manieră dependentă de doză: concentrațiile scăzute de acid retinoic activează genele din capătul 3' al grupurilor Hox, în timp ce concentrațiile mari sunt necesare pentru activarea genelor din capătul 5'. În sistemul nervos central, acidul retinoic induce exprimarea anterioară a genelor care se exprimă în mod normal în regiunile posterioare și determină rombomerele doi și trei să-și asume identitatea rombomereleor patru și cinci. În această situație, nervul trigemen (care se formează în mod normal din rombomera doi) este transformat într-un nerv facial suplimentar (format în mod normal din rombomera patru). Toate aceste rezultate au demonstrat că acidul retinoic joacă un rol important în specificarea axei antero-posterioare, în cursul dezvoltării embrionare normale.

Acidul retinoic este un compus asemănător carotenilor, înrudit cu vitamina A. În organism, vitamina A și acidul 13-cis retinoic pot suferi izomerizări și se transformă în forme active ale acidului retinoic și anume, toate formele trans ale acidului retinoic și acid 9-cis retinoic (Creech Kraft, 1992).

Acidul retinoic nu se poate lega direct la gene, ci acționează asupra reglatorilor, prin legarea sa la un grup de factori de transcriere denumiți receptori ai acidului retinoic (RAR). Aceste proteine au aceeși structură ca și receptorii pentru hormonii steroizi și tiroidieni (Linney, 1992). RAR cuplați cu acidul retinoic se leagă la regiuni enhancer specifice, cunoscute sub numele de *elemente de răspuns la acidul retinoic*.

Există trei tipuri majore de RAR: RAR-a, RAR-b și RAR-g. Fiecare din ele se poate lega de ambele forme ale acidului retinoic și împreună se pot atașa la același element de răspuns la acidul retinoic.

În plus, exista o a doua familie de RAR, receptorii retinoizi RXR, ce leagă numai acidul 9-cis retinoic. Activarea promotorilor sensibili la acid retinoic este determinată de atașarea heterodimerilor RAR-RXR la elementele de răspuns la acidul retinoic. Unele dintre genele HOX prezintă în promotorii lor elemente de răspuns la acidul retinoic (Yu și colaboratorii, 1991; Pöpperl și Feathersone, 1993)

Acidul retinoic legat de RAR poate acționa în două moduri:

– se poate lega la secvențe enhancer și activează gene particulare, ce nu sunt activate în mod normal în acele celule. Aceste gene pot fi diverse gene homeotice ce specifică axa antero-posterioară a corpului. Astfel, apar mutațiile homeotice, reprezentate prin conversia structurilor anterioare în structuri posterioare;

– acidul retinoic legat la RAR poate inhiba unele gene care sunt activate de alți factori de transcripție ce se leagă la regiunile enhancer, și anume factorul AP-1. AP-1 este important în activarea diviziunii celulare și acidul retinoic poate determina astfel inhibarea diviziunii celulare normale.

Efectul genelor homeotice este bidirecțional, determinând inducerea și represia activității altor gene datorită interacțiunilor cu diferiți factori de transcripție și mai puțin datorită naturii secvențelor ADN țintă. Activitatea genelor homeotice influențează migrarea, poziționarea și dezvoltarea diverselor celule din embrioni prin reglarea activității genelor care codifică molecule semnalizatoare dintre celule și moleculele care asigură adeziunea celulară.

6. EVOLUȚIA GENELOR HOMEOTICE

Compararea genelor homeotice la diferite specii a permis reconstituirea unui model al evoluției acestora dintr-un strămoș comun.

Acest organism ancestral comun conținea un grup de cel puțin cinci gene homeotice: *labial, proboscipedia, deformed, Antennapedia* și *Abdominal B*. Genele din subfamiliile 5-8 de la mamifere și genele *sex combs reduced, Ultrabithorax* și *Abdominal A* de la *Drosophila* pot avea originea în duplicații independente ale genelor originare. Genele din subfamiliile doi și trei au derivat prin duplicarea unei singure gene ancestrale, tip *proboscipedia*, numai în ramura care a condus la vertebrate.

La *Amphioxus* , cordat primitiv, există un complex Hox asemănător cu grupul HoxA de la mamifere. Duplicarea în tandem poate avea loc prin diferite mecanisme

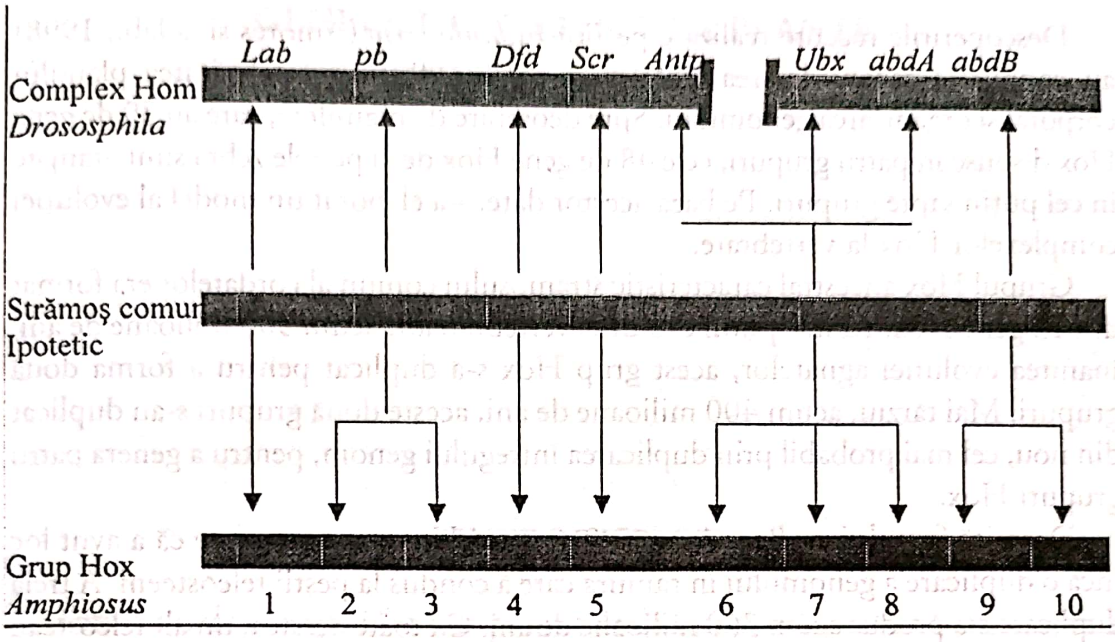


Fig 6 — Relaţiile evolutive dintre genele Hox de la un strămoş comun ipotetic, de la *Drosophila* şi *Amphioxus.* (adaptat după Wolpert şi colab., 1998).

în timpul replicării ADN şi furnizează embrionului o copie suplimentară a genei. Această copie are o secvenţă nucleotidică uşor diferită şi capătă o funcţie nouă.

La mamifere, genele care prezintă cea mai mare asemănare din punct de vedere al secvenţei homeodomeniului sunt grupate în 13 subfamilii. Fiecare subfamilie prezintă asemănări cu o genă de la *Drosophila.*

Insectele şi vertebratele au folosit strategii genetice diferite pentru a dezvolta complexitatea funcţională a aceleiaşi gene; insectele prin diversificarea secvenţelor reglatorii, vertebratele prin creşterea numărului de gene, prin duplicare.

Toate genele Hox prezintă două caracteristici importante:

1) genele individuale sunt organizate în unul sau mai multe grupuri;

2) ordinea exprimării genelor de-a lungul axei antero-posteioare corespunde, de obicei, ordinii cromozomale.

Aparenta universalitate a genelor Hox şi a altor gene în embriogeneza animală a condus la elaborarea conceptului de **zootip**, care defineşte modelele exprimării acestor gene de-a lungul axei antero-posterioare la toate organismele.

Rolul de bază al genelor Hox este specificarea identităţii poziţionale în embrion şi nu dezvoltarea unei structuri. Aceste valori poziţionale sunt interpretate diferit, în fiecare tip de embrion, pentru a stabili modelul în care se dezvoltă celulele dintr-o anumită regiune. Genele Hox îşi exercită influenţa prin acţiune asupra genelor care controlează dezvoltarea structurilor corporale (Zărnescu, 1999).

Descoperirile recente realizate pe *Brachydanio rerio* (Amores și colab., 1998) au condus la reconsiderarea legăturii evolutive dintre complexitatea planului corporal și organizarea genomului. Spre deosebire de mamifere, care au 39 de gene Hox dispuse în patru grupuri, cele 48 de gene Hox de la peștele zebră sunt aranjate în cel puțin șapte grupuri. Pe baza acestor date, s-a elaborat un model al evoluției complexelor Hox la vertebrate.

Grupul Hox ancestral caracteristic strămoșului comun al cordatelor era format din 13 gene Hox. La începutul evoluției vertebratelor, acum 500 milioane de ani, înaintea evoluției agnatelor, acest grup Hox s-a duplicat pentru a forma două grupuri. Mai târziu, acum 400 milioane de ani, aceste două grupuri s-au duplicat din nou, cel mai probabil prin duplicarea întregului genom, pentru a genera patru grupuri Hox.

Datorită faptului că *B. rerio* are 7-8 grupuri Hox, se presupune că a avut loc încă o duplicare a genomului în ramura care a condus la peștii teleosteeni. A treia duplicare s-a produs acum 360 milioane de ani. Cu toate acestea, un alt teleostean *Fugu rubripes* are doar 31 de gene Hox. Acest pește are un genom neobișnuit de mic și în plus o morfologie din care lipsesc câteva seturi de înotătoare și oase. Această variabilitate între grupurile Hox la specii înrudite sugerează o pierdere independentă a genelor Hox și chiar a unor grupuri întregi la diferiți pești. Se poate presupune că pierderea unor apendici este asociată cu reglarea diferită sau chiar pierderea genelor Hox.

Aparenta accelerare a evoluției genomice și numărul mai mare de gene poate fi rezultatul unei duplicații genomice caracteristice acestor vertebrate și poate fi corelată cu evoluția morfologică rapidă și cu speciația la pești (Meyer și Malaga-Trillo, 1999).

CAPITOLUL XV

GENELE HOMEOTICE LA PLANTE

1. INTRODUCERE

Termenul de „*homeosis*“ a fost propus de către Bateson, în anul 1894, spre a desemna asumarea de către un membru al unei serii merice a formei și a caracterelor altor membrii ai seriei. Încă din anul 1778, marele poet și savant german J.W.v Goethe a descoperit că plantele constau din numeroase organe omoloage și că transformarea progresivă, pe care a numit-o *morfogeneză*, survenită în timpul acestei dezvoltări începe cu formarea frunzelor și se termină cu formarea părților care alcătuiesc florile. El este autorul concepției despre *metamorfoza frunzei în floare*.

După punerea la punct a metodelor de biologie moleculară, stabilite la *Drosophila melanogaster*, la care au fost descoperite anumite gene care au capacitatea de a controla dezvoltarea organelor normale la locuri potrivite, studiile au continuat și la plante, la care au fost identificate numeroase mutante, caracterizate prin transformarea unui organ în altul. Genele implicate în aceste procese, au fost numite **gene homeotice** și ele sunt cunoscute ca având rol în controlul organelor la toate eucariotele pluricelulare.

Reglarea dezvoltării la nivel molecular la plante este bine înțeleasă în ceea ce privește diferențierea florilor. Aceste procese încep atunci când meristemele vegetative răspund la semnale de inducție florală, generate în corpul plantei, ca rezultat al acțiunii semnalelor din mediul extern, cum ar fi lungimea zilei, și se încheie cu transformarea acestor meristeme vegetative în inflorescențe sau meristeme florale.

1. Caracteristici structurale ale genelor implicate în procesul de dezvoltare-MADS — boxes

Genele homeotice (*homeobox*) sunt gene ce codifică pentru domenii proteinice, cu rol în procesul de dezvoltare. Fiecare genă homeotică are un **domeniu**

caracteristic de acțiune, definit ca o regiune a corpului ce suferă o transformare în cazul mutației genei respective.

MADS box sunt secvențe conservate, motive ce aparțin unor familii de factori transcripționali, aceste domenii conservate fiind recunoscute după primii patru membrii ai familiei: MCM 1, AGAMOUS, DEF, SRF.

Studiile de genetică moleculară realizate la *Arabidopsis* și gura leului, precum și la alte specii, au demonstrat existența mai multor gene implicate direct în dezvoltarea florală. Multe din aceste gene conțin domenii MADS-box, care sunt implicate în legarea de ADN și domenii K-box, care sunt implicate în dimerizarea proteinică. (19)

Genele MADS-box joacă un rol important în timpul dezvoltării și evoluției florale și codifică pentru factori transcripționali cu rol în transducția semnalelor și controlul dezvoltării plantelor. Domeniile MADS-box sunt domenii conservate, de 55 aminoacizi lungime și cu un capăt N terminal al proteinei ce prezintă omologie cu domeniile K-box. Domeniile MADS sunt similare și cu alte domenii de la eucariote ce includ: invertaza I, keratin-like, C-terminal.

Există mai multe familii de proteine MADS ce au fost subdivizate în două subfamilii: 1. factori cu rol în procesul de dezvoltare;
2. factori cu rol în arhitectura moleculară, morfologia florală.

Mai mult de 12 gene MADS-box au fost identificate la *Arabidopsis*, *Zea*, *Asparagus*, *Lycopersicon*, dar și la unele gimnosperme. Funcția acestor gene nu este cunoscută cu exactitate, dar s-a demonstrat că ea se exprimă exclusiv în flori, sugerând astfel rolul lor în dezvoltarea florală.

Factorii MADS, spre deosebire de genele HOX de la animale, care sunt grupate în clusteri, sunt distribuiți împrăștiat în genomul plantelor. Genele MADS box sunt implicate în diversificarea florală, deoarece ele reglează majoritatea căilor de morfogeneză florală.

Analizele filogenetice ale genelor MADS box au relevat faptul că aceste gene sunt organizate în grupuri distincte, membrii fiecărei grupe având un rol similar în dezvoltarea florală. Genele MADS controlează formarea meristemelor florale, formarea organelor florale și identitatea de organ.

Analize moleculare au relevat faptul că aceste gene s-au conservat în evoluție, deoarece există gene ancestrale în fiecare din acest grup care au luat naștere înaintea apariției plantelor cu flori.(19)

Studiile au demonstrat existența a două procese cheie implicate în stabilirea structurii organelor aeriene la plante. Primul proces constă în *stabilirea structurii meristemului apical,* incluzând poziția și dezvoltarea primordiilor, iar al doilea proces se referă la *specificarea identității dezvoltării acestor primordii.*

2. Procesele de inducție (inițiere) florală

Angiospermele reprezintă un grup de plante întâlnite din abundență peste tot în lume, având structuri sofisticate de reproducere, care au făcut obiectul a numeroase studii cu privire la identificarea genelor implicate în dezvoltarea florală.

Florile iau naștere din meristeme apicale ale lăstarilor. Meristemele sunt mici populații de celule stem care se divid cu ritmuri intense pentru a produce celule identice din care prin diferențiere vor da naștere organelor florale. Organele florale iau naștere secvențial, începând de la formarea sepalelor urmată de formarea petalelor și staminelor și în final formarea carpelelor.

Descoperirea mutantelor „lipsite de funcție", în care florile sunt înlocuite cu structuri intermediare între lăstari vegetativi și florali, relevă existența unor reglatori care controlează procesele de inițiere florală (FLIP).

Unul dintre evenimentele importante cu rol în dezvoltarea florilor la plante îl reprezintă *fotoperiodismul.* Multe specii de plante au nevoie pentru a înflori de o fotoperioadă corectă.

Numeroase studii, implicând genele pentru fitocromi la *Arabidopsis*, au demonstrat că fiecare floare este dependentă în mare măsură de fotoperiodism.(9) De exemplu, fotoreceptorii pentru culoarea albastră apar ca jucând un rol important în răspunsul fotoperiodic al câtorva specii.

În ceea ce privește semnalele care sunt transmise la meristeme, s-au adus argumente privitoare la existența unor substanțe difuzibile, cum ar fi „florigenul", precum și a cel puțin unei gene implicată în transmiterea semnalelor.

De exemplu, la *Arabidopsis,* există gene implicate în medierea semnalelor răspunzătoare de dezvoltarea florală, în funcție de semnalele fotoperiodice. Una din aceste gene este gena CONSTANS (CO), care este transcripțional activă, răspunsul său este indus de fotoperiodism, iar mutantele CO se caracterizează printr-o perioadă de înflorire foarte târzie.

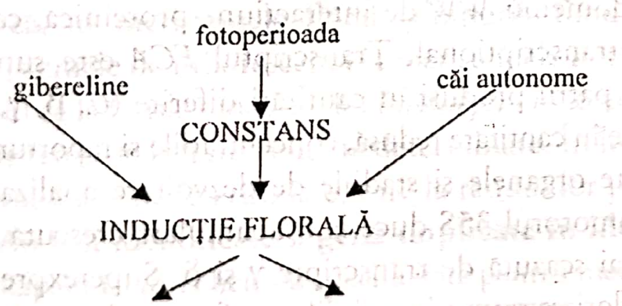


Fig. 1 — Trei căi pentru inducție florală: *constans* codifică pentru un regulator transcripțional stimulat de fotoperiodism: ca răspuns la aceste semnale, în meristemele florale sunt activate genele LEAFY și APETALA 1.

Gena CO codifică pentru o proteină zinc-finger care, alături de factorul transcripțional GATA-1, semnifică faptul că produșii transcripționali ai genei CO produc factori specifici pentru formarea florilor și răspund de semnalele luminoase. Totodată, s-a evidențiat faptul că nivelul expresiei CO este critic pentru inducția florală.(figura 1).(10,11)

LFY și API sunt considerate ca jucând primul rol în inițierea programului de înflorire.

Pe de altă parte, s-a evidențiat faptul că și hormonii plantelor, cum ar fi giberelinele au rol în înflorirea indusă de fotoperiodism.(fig.1) La alte specii de plante, la care florile nu sunt induse de fotoperiodism, există și căi autonome care contribuie, de asemenea, la inducția florală.(fig.1)

Gena *FHA* codifică un receptor albastru pentru lumină. Mutația *lhy* determinată de superexpresia unui factor *MYB* de transcriere, strâns înrudit cu *CCA1*, determină înflorirea târzie, insensibilă la fotoperiodism, și perturbează funcționarea ritmului circadian. Un fenotip similar este cauzat de superexpresia factorului *CCA1*, sugerând rolul ritmului circadian în controlul înfloririi, ca răspuns la fotoperiodism, așa cum a fost anterior sugerat de către fenotipul mutantei *3*, care determină înflorirea timpurie și implicit perturbarea funcționării ritmului circadian.

La *Arabidopsis* au fost identificate și clonate două gene cu rol în activarea căilor autonome pentru inducția florală și care codifică pentru proteine reglatoare. De exemplu, gena LUMIDEPENDENS (LD) codifică pentru un produs care este similar cu un activator transcripțional și include o regiune bogată în glutamină și un homeodomeniu-like motiv.(12) Genele *LD* și *FCA* codifică pentru proteine reglatoare, respectiv un factor de transcriere și o proteină de legare a ARN. Proteina *LD* formată din 953 aminoacizi, include două semnale bipartite cu localizare nucleară, un domeniu bogat în *Gln*, la capătul carboxi- terminal, similar celui întâlnit la activatorii transcrierii de la mamifere, și un homeodomeniu prezumtiv, în regiunea amino- terminală. Gena *FCA* codifică o proteină care conține două domenii de legare a ARN și un domeniu *WW* de interacțiune proteinică, care funcționează ca un reglator posttranscripțional. Transcriptul *FCA* este supus splicing-ului alternativ, generând patru produși în cantități diferite (α, β, γ, și δ). Transcriptele *FCA* sunt prezente în cantitate redusă, concentrațiile și raporturile dintre ele fiind constante în toate organele și stadiile de dezvoltare analizate. Transcrierea genei *FCA* de la promotorul 35S duce la o acumulare crescută de transcript β și la o acumulare mai scazută de transcripte γ și δ. Superexpresia transcriptului β nu a reinstaurat înflorirea timpurie în liniile *fca*, fenotipul 35S::*FCA* datorându-se unei creșteri mici a cantității de transcript γ, singurul produs care codifică proteina *FCA* de lungime normală.

Cercetări privind genele homeotice la plante s-au realizat prin studiul mutantelor homeotice la genurile *Arabidopsis* și *Antirrhinum*, precum și la alte angiosperme.

3. PRINCIPALELE MUTANTE HOMEOTICE LA *ARABIDOPSIS THALIANA*

La *Arabidopsis thaliana*, meristemele apicale generează primordii pe flancuri în spirală, iar procesele de dezvoltare a acestor primordii sunt specifice pentru frunze cu meristeme axilare, frunze cauline cu meristeme similare sau flori.

Au fost identificate mai multe clase de mutante ale genelor implicate în procesul dezvoltării organelor florale, la *Arabidopsis thaliana*, și anume:

1) mutante ale genelor ce afectează dezvoltarea primordiului floral;
2) mutante ale genelor ce afectează simetria;
3) mutante ale genelor ce afectează identitatea de organ.

4. MUTAȚII ALE GENELOR CE AFECTEAZĂ DEZVOLTAREA PRIMORDIULUI FLORAL

Dintre mutantele identificate la *Arabidopsis*, având afectată dezvoltarea primordiului floral, cele mai importante sunt:

a) **sterilis**- prezența de brectee fără flori în axila bracteelor;

b) **steriloides**- prezența de bractee doar în inflorescențe;

c) **squamosa**- inițierea primordiului este normală dar, în loc de flori, prezintă axe nedeterminate care seamănă cu inflorescența, crescute în axilele bracteelor;

d) **floricaula**- exprimarea genei *flo* are loc secvențial, în primordiile foarte timpurii ale bracteelor, sepalelor, petalelor și carpelelor, nu însă și în stamine. Produsul genei *flo* pare a fi implicat în direcționarea modelelor specifice de expresie genică, în meristemele florale timpurii, fiind necesar pentru tranziția de la meristemele de inflorescență la meristemele florale. Studii recente au demonstrat faptul că la florile mutante de *Arabidopsis*, în locul meristemelor florale, se dezvoltă meristeme de inflorescență nedeterminate. În locul florilor, în axila bracteelor se dezvoltă axe nedeterminate, care la rândul lor poartă bractee.

Au fost identificate și **gene implicate în identitatea meristemelor apicale.** Principalii factori cheie cu specificitate pentru meristemele florale includ mutantele: **LEAFY, APETALA 1 și CAULIFLOWER.**

Ca răspuns la inducția florală, meristemele vor da naștere la flori. La *Arabidopsis*, au fost identificate două gene responsabile de identitatea și specificitatea meristemelor florale, și anume LEAFY și APETALA 1. Mutații în fiecare din aceste gene LFY și AP1 cauzează substituirea meristemelor florale cu apariția de inflorescențe nedeterminate.(13) LFY și AP 1 nu sunt întotdeauna necesare pentru formarea meristemelor florale; expresia ectopică a fiecăreia dintre gene este suficientă pentru a induce identitatea meristemelor florale. Expresia ectopică a genei LFY are ca efect convertirea meristemelor de inflorescență la meristeme florale.(13) *LFY* este un produs nuclear capabil de a lega ADN *in vitro*, deși este diferit de ceilalți factori de transcriere cunoscuți (Weigel, 1995). *AP2* codifică o proteină care prezintă un domeniu nou de legare la ADN, având omologie cu proteinele de legare de elementul de răspuns la etilen (Jofuku și colaboratorii, 1994; Weigel, 1995).

Mutantele *lfy* formează lăstari axilari în locul florilor și nu formează petale sau stamine. La dublu mutantele *lfy/ap1* apar extrem de rar structuri tip floare (Shannon si Meeks-Wagner, 1993). Mutațiile genei *CAL* intensifică efectul mutațiilor *ap1*. Efectul mutațiilor *ap2*, la nivelul identității meristemelor florale, a fost observat deoarece mutațiile *ap2* intensifică fenotipul mutantelor *ap1* și *lfy*. Redundanța celor patru gene de identitate a meristemelor florale indică faptul că ele prezintă funcții care se suprapun parțial. De exemplu, dublu mutantele *ap1/cal* nu exprimă *LFY* și nici *AP1*.

Pe de altă parte, activarea genei TERMINAL FLOWER (TLF) are ca efect inducerea expresiei genelor LFY și AP1 din meristeme de inflorescență, la meristeme florale, cu flori terminale(14).

Aceste rezultate sugerează faptul că LFY este activată prin gibereline, având ca efect inducția florală.(fig.1) Analiza unor dublu mutante AP1 și LFY a arătat că multe gene ale căii autonome sunt necesare pentru promovarea expresiei genei AP1 care mai departe are efect inductiv, mediind activarea LFY.(15)

Studii recente au arătat că LFY codifică pentru un produs similar cu alte proteine cu funcții biochimice cunoscute, dar s-a demonstrat faptul că totuși, LFY codifică pentru un activator transcripțional care se leagă de secvențele promotorului AP1.(15) AP 1 codifică pentru un produs care prezintă similitudine cu cei din familia MADS-box, conținând factori transcripționali legați la ADN.

Cel mai important rol al genelor AP1 și LFY este acela de a stabili atât identitatea meristemelor florale, cât și reglarea transcripțională a genelor cu identitate de organ.

În anul 1992, LEYSER și FURNER au arătat că plantele *Arabidopsis* prezintă și alte tipuri de gene implicate în determinarea specificității meristemelor florale, cum ar fi CLAVATA 1, FASCINATA 1 și FASCINATA 2, ale căror mutații determină dezvoltarea unor inflorescențe fascinante, dar și o alterare a dezvoltării frunzelor.(4)

Florile mutantelor **CLAVATA** sunt spiralate, aceste flori spiralate nefiind prezente și la tipul sălbatic. Studii recente au demonstrat că dublu mutanți, CLAVATA 1 cu AGAMOUS și CLAVATA 1 cu APETALA 1, APETALA 2, și PISTILATA, indică rolul și controlul CLAVATA în structura meristemului floral, iar dublu mutanți CLAVATA cu LEAFY și APETALA 1, indică faptul că CLAVATA joacă un rol important în stabilirea identității meristemelor florale, precum și în controlul mărimii meristemelor.

Au fost analizate genetic și morfologic o serie de mutante cu modificări la nivelul locusului CLAVATA. S-a demonstrat faptul că *clv* 1 degradează structura meristemului apical, prin amplificarea alelelor slab exprimate, determinând o proliferare a alelelor profunde.(4)

Au fost observate, de asemenea, creșteri ale mărimii primordiilor florale, în stadiul de inițiere al organelor, precum și un grad crescut al mărimii meristemelor florale, corelat cu numărul de organe florale la alelele mutante. Au fost raportate cazuri în care alelele *clv 1* degradează structura meristemelor florale, prin dezvoltarea unor carpele spiralate, în interiorul gineceului, generând patru carpele spiralate.

Au fost relatate interacții genice între mutantele *clv 1* și alte 6 mutante. Astfel, a fost observat un fenotip nou ce se datorează interacției între mutantele *clv 1* și *ap 2, ap3, pi* și *ag,* indicând faptul că *clv 1* afectează structura meristemelor florale, la nivelul cărora acționează aceste gene. Combinații între *clv 1* și *ap 1* au ca rezultat transformarea centrului florii în țesut meristematic, iar combinațiile cu *lfy* duc la o transformare completă a florilor în lăstari.

Alelele mutante *EMBRYONIC FLOWER 1 (EMF1)* inițiază înflorirea fără formarea unei rozete foliare. Aceste mutante formează papile stigmatice și structuri de tip ovule pe suprafața cotiledoanelor lor, iar lăstarii nu produc frunze în rozetă, ci formează adesea structuri carpeloide, cu caracteristici de ovule, și care se termină cu un pistil sau cu o floare (Castle si Sung, 1995). Alelele *emf1* și *emf2* formează frunzulițe.

Genele *EMF* reglează negativ trecerea de la dezvoltarea vegetativă la cea reproductivă, precum și expresia lui *AP1*, în țesutul vegetativ. Înflorirea foarte timpurie a mutantelor *emf* indică faptul că genele *EMF* reprezintă represori centrali ai înfloririi, iar când activitatea lor scade sub un anumit prag critic, plantele trec de la dezvoltarea rozetei la cea a inflorescenței, și de la dezvoltarea inflorescenței, la formarea unei singure flori (Chen și colaboratorii, 1997). Mutațiile *co* și *gi* care întârzie înflorirea nu au efect asupra fenotipului *emf* la dublu mutante, ceea ce sugerează că rolul acestor gene de control al timpului de înflorire este de a reprima funcționarea produsului *EMF*, și că, în absența genei *CO* sau a genei *GI*, timpul de înflorire este întârziat prin creșterea funcției genei *EMF* (Weigel și colaboratorii, 1995).

5. MUTAȚII ALE GENELOR CE AFECTEAZĂ SIMETRIA

Dintre mutantele ce afectează simetria cele mai des întâlnite sunt:

Antirrhinum tipul sălbatic cu flori asimetrice :

- *Cycloidea* și *Dichotoma* — flori abaxiale, cu simetrie radială

- *Cyh, dicho* factori transcripţionali omologi cu factorul TBL1, de la porumb, alcătuit din 62 de aminoacizi
- *centroradialis* simetrie radială o floare terminală
- *Arabidopsis :*
- *gena PHANTASTICA* flori luxuriante
- Gena *fil* – afectează simetria, flori aberante cu poziţie aberantă, flori deformate, la care lipsesc organele florale, urmate de 20 noduri filamentoase şi apoi alte flori aberante.

Mutante ce afectează identitatea de organ

Cele mai studiate mutante la *Arabidopsis* au fost cele care afectează identitatea de organ. Identitatea organelor florale este specificată de prezenţa a trei clase de gene notate A, B, C.(fig.3) Combinarea funcţiei celor trei clase de gene, pentru apariţia lăstarilor şi florilor, pare a fi suficient de specifică în identitatea şi diferenţierea organelor florale. Toate aceste gene sunt codificate de factori transcripţionali, care sunt specifici pentru fiecare organ floral.

Existenţa mutantelor ce afectează identitatea de organ sugerează că dezvoltarea florilor, este sculptată de gene selectoare homeotice (gene de identitate a organelor florale) a căror expresie induce determinarea formării de organe florale diferite identităţii lor. Aceste gene pot fi considerate ca activând ca un comutator major al dezvoltării, care activează întregul program genetic.

A fost propus un model numit „modelul ABC timpuriu", care se bazează pe starea de expresie de tipul „*on* sau *off*„ a trei gene diferite *a, b şi c,* specifice identităţii a patru organe florale. De exemplu, s-a presupus următorul model al expresiei genelor *a, b,c* în diferite organe florale: „*on, off, off*" în sepale, „*on, on, off*" în petale, „*off, on, on*" în stamine şi „*off, off, on*" în carpele.

În 1991, a fost propus un alt model, numit „modelul clasic ABC", care a fost în mare măsură acceptat până acum, să explice cum genele homeotice controlează identitatea de organ (fig. 2).(20)

Similar cu modelul timpuriu ABC, modelul clasic ABC susţine că identitatea de organ în fiecare cerc este determinată printr-o combinaţie a activităţii a trei gene cu identitate de organ numite A, B, C.(20)

Când A funcţionează singură, ea este responsabilă de identitatea sepalelor, A şi B împreună sunt specifice pentru petale, iar B şi C sunt responsabile de dezvoltarea staminelor. C este responsabil de dezvoltarea carpelelor, iar A şi C au funcţii antagoniste, în sensul că atunci când acţionează A, funcţia C este blocată,

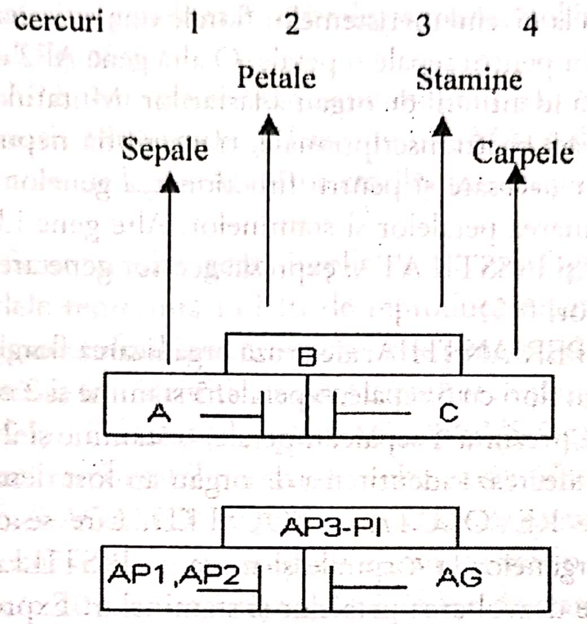

cercuri
1
2
3
4
Petale
Stamine
Sepale
Carpele
B
A
C
AP3-PI
AP1,AP2
AG

Fig. 2 — Modelul clasic ABC pentru identitatea de organ la *Arabidopsis*; identitatea de organ florală este specificată prin funcțiile homeotice A, B, C, care sunt fiecare active în două cercuri adiacente; A specifică pentru sepale, A și B pentru petale, B și C specifice pentru stamine și C pentru carpele. A și C au activitate antagonistă.

în periant (sepale și petale), iar C blochează A, la nivelul organelor de reproducere (stamine și carpele).(2)

De exemplu, AP1, pe lângă rolul său în inducția meristemelor florale, împreună cu funcția genelor din clasa A, în care acestea sunt funcționale, este solicitată pentru specificitatea identității formării lăstarilor. Concomitent cu acest dublu rol, AP1

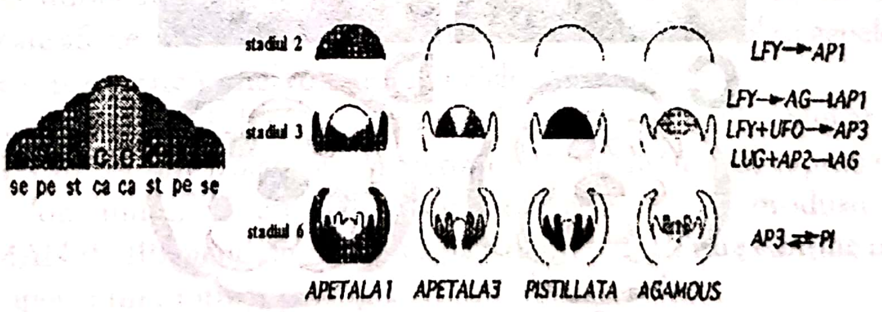

stadiul 2
LFY→AP1
stadiul 3
LFY→AG⊣AP1
LFY+UFO→AP3
LUG+AP2⊣AG
se pe st ca ca st pe se
stadiul 6
AP3⇄PI
APETALA1
APETALA3
PISTILLATA
AGAMOUS

Fig. 3 — Modelul genelor ABC și expresia genelor cu identitate de organ. A+B specifice pentru identitatea petalelor; B+C specifice pentru identitatea staminelor; C pentru identitatea carpelelor.

este inițial exprimată la nivelul meristemelor florale tinere și, mai târziu, la nivelul inducerii primordiilor pentru sepale și petale. O altă genă AP2 este activată având rol tot în specificarea identității de organ a lăstarilor. Mutațiile la nivelul acestei gene duc la modificări posttranscripționale, transcripția neputând fi localizată. Cele două gene sunt necesare și pentru funcționarea genelor din clasa B, gene specifice pentru formarea petalelor și staminelor. Alte gene identificate în clasa B sunt APETALA 3 și PISSTILATA; expresia acestor gene are ca efect formarea petalelor și staminelor. (15)

O altă mutantă, PERIANTHIA, afectează organizarea florală, această mutantă caracterizându-se prin flori cu 5 sepale, 5 petale, 5 stamine și 2 carpele, comparativ cu tipul sălbatic care prezintă 4 sepale, 4 petale, 6 stamine și 2 carpele. (fig.4)(5)

Alte mutante ce afectează identitatea de organ au fost descrise în ultimii ani și anume mutantele REVOLUTA și TOUSLED, care se caracterizează prin reducerea tuturor organelor la 4 spirale și mutanta PISTILLATA, ce cuprinde gene responsabile de dezvoltarea petalelor și staminelor. Expresia PISTILLATA este indusă în stadiul 3 al înfloririi (expresie timpurie), apoi până la antere (expresie târzie).(3) Gena *pistillata* nu este necesară pentru inițierea formării petalelor, ci controlează doar stadiile târzii ale dezvoltării petalelor. Mutanta se caracterizează prin formarea unui organ în mozaic, care are trăsături atât de petale, cât și de sepale, și care poate rezulta din suprapunerea programelor care acționează la un anumit moment. Pentru dezvoltarea unei flori normale, trebuie să existe o

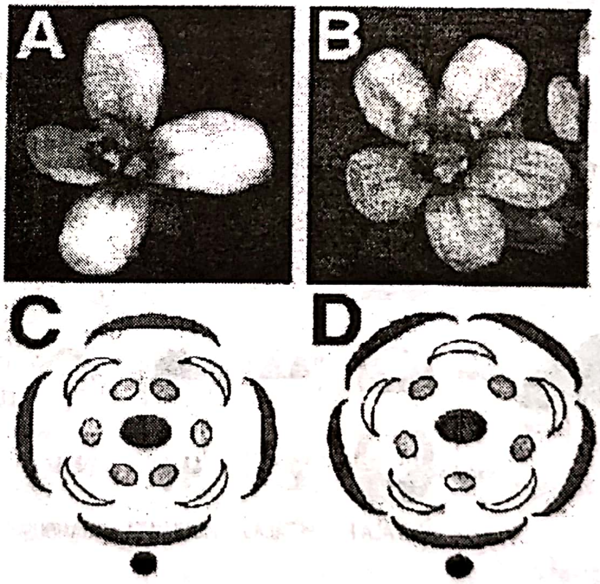


Fig. 4. A – Tipul sălbatic de floare, la *Arabidopsis*; B – mutanta *Perianthia*; C – diagrama și poziția organelor la tipul sălbatic; D – diagrama și poziția organelor la mutanta *Perianthia*.

concordanță perfectă între genele care controlează momentul inițierii primordiilor și identitatea cascadei genice.

Cu excepția lui AP2, toate genele ABC sunt puternic conservate, sunt secvențe de ADN de aproximativ 180 perechi de baze, numite MADS-box. Aceste secvențe codifică pentru domenii de legare ADN a factorilor transcripționali ai domeniului MADS-box.(20)

Au fost identificate și alte gene implicate în morfogeneza carpelelor la *Arabidopsis.* Carpelele reprezintă unități de reproducere feminine și ele includ ovulele care poartă gametofitul feminin și care este penetrat de gametul masculin.

Tot la *Arabidopsis* au fost identificate gene care sunt responsabile de dezvoltarea staminelor și carpelelor. De exemplu, gena AGAMOUS (ag) codifică pentru un factor transcripțional responsabil pentru dezvoltarea staminelor și carpelelor.(1)

Mutații ale genei AGAMOUS determină absența staminelor și carpelelor, dezvoltarea lor în locul staminelor, dând așa numitul fenotip de *„floare în floare*“. O floare mutantă are 10 petale (4 normale, 6 în loc de stamine), 4 sepale și în interiorul petalelor alte 10 petale și 4 sepale.

Locusul *ag* a fost identificat în cromozomul 4, gena are cel puțin 9 exoni și 8 introni, iar produsul proteinic are cel puțin 238 de aminoacizi.

Rolul AGAMOUS este specific în identitatea carpelelor și indirect poate funcționa împreună cu APETALA 2, determinând modificări la nivelul carpelelor.(1)

Pe de altă parte, au fost identificate și alte gene responsabile de dezvoltarea carpelelor și anume genele CRABS CLAW și SPATULATA.(2)

Mutantele CRABS CLAW se caracterizează prin dezvoltarea unui gineceu mic și a două carpele care fuzionează la nivelul apexului. Mutanții celei de a doua gene, SPATULATA, se caracterizează printr-o reducere semnificativă a stilului, stigmei și septumului, iar canalul de fecundare este absent.

Analiza dublu mutantelor CRABS CLAW și SPATULATA, ca și a altor mutante care afectează dezvoltarea carpelelor, a demonstrat faptul că genele acestea constituie o necesitate în dezvoltarea carpelelor.(2)

Au fost identificate și alte gene cu specificitate pentru clasa C, cum ar fi genele LEUNIG, care au fost izolate și caracterizate. Pe de altă parte, expresia genelor specifice domeniului B este, de asemenea, activată de produșii genelor SUPERMAN (SUP), gene care codifică pentru un produs care conține un motiv leucine- ziper și un motiv zinc-finger.(16)

Studii recente au demonstrat faptul că genele cu identitate de organ pot fi reglate și la nivel epigenetic. Metilarea cromatinei este implicată în reglarea negativă a activității genelor AG și AP3. Plantele transgenice cu nivel redus al citozinei metilate manifestă activarea ectopică a genelor AP3 și AG, la acest nivel.(17)

Există numeroși cofactori care modulează funcția genelor cu identitate de organ. Proteine MADS-box au fost identificate la *Arabidopsis,* care pot heterodimeriza cu produșii genelor AG și se pot lega in vitro de ADN.(18)

Se poate spune că toți produșii genelor ABC controlează transcripția altor gene (gene țintă) ai căror produși sunt direct sau indirect implicați în formarea sau în funcția acestor organe.

Recent au fost studiate noi funcții ale genelor homeotice; este vorba de unele gene care aparțin unor subfamilii ale genelor MADS-box și anume genele AGL2-like.

Prezența membrilor acestei subfamilii de gene la diverse plante cu flori sugerează că aceștia au o importanță deosebită și sunt puternic conservați, ca funcție.

Recent, la modelul ABC, s-a adăugat și sectorul D, la nivelul căruia inducția genelor FBP 7 și FBP 11 determină formarea ovulelor în periant, la florile transgenice de petunie.

S-au făcut unele studii la plante transgenice, în care expresia genelor AGL2, și anume, FBP2 de petunie sau TOMATO –box5 (TM5) de la tomate (*Lycopersicon esculentum)* a fost inhibată prin co-supresie sau tehnologie antisens și a determinat dezvoltarea de flori aberante, cu modificarea cercurilor 2, 3 și 4, determinând transformarea homeotică la organe sepaloide. Pornind de la aceste date, studiile realizate la *Arabidopsis* au sugerat că genele AGL2-like acționeză ca mediatori între meristemele florale și genele cu identitate de organ.(20)

Trei gene AGL2-like de la *Arabidopsis,* AGL2, AGL4 și AGL9 sunt exprimate, pe de o parte, în al doilea, al treilea și al patrulea cerc al primordiului organelor florale iar, pe de altă parte, AGL2 și AGL 4 sunt exprimate de asemenea, în exteriorul cercurilor de dezvoltare ale florilor.

O singură mutație a uneia dintre cele trei gene generează producerea unor fenotipuri subtile, în timp ce tripla mutație în care AGL2, AGL4 și AGL9 sunt lipsite de funcție, are ca rezultate transformarea tuturor organelor în sepale, iar florile devin axe nedeterminate.

Aceste date indică faptul că AGL2, AGL4 și AGL9 au funcții redundante care sunt necesare pentru dezvoltarea petalelor, staminelor și carpelelor și previn creșterea nedeterminată a organelor florale.

6. PRINCIPALELE MUTANTE HOMEOTICE LA *ANTIRRHINUM MAJUS*

Cercetări privind genele homeotice s-au realizat și la *Antirrhinum majus,* datorită genomului mic, florilor mari, propagării vegetative ușoare, elementelor transpozabile bine caracterizate.

Cele mai bine caracterizate mutante au fost cele implicate în identitatea de organ, mutante ce se caracterizează printr-o sensibilitate la condițiile de mediu.

Au fost identificate trei clase de mutante: *tip I*, care afectează cercul I și II de organe, *tip II*, care afectează cercul III și IV de organe și *tip III*, care afectează cercul II și III.(8)

O altă genă implicată în identitatea de organ este gena DEFICIENS (*def A*) care determină celulele meristemului floral să se diferențieze în organul potrivit, la locul potrivit. Mutantele *def* sunt sensibile la variații ale temperaturii. De exemplu, la temperaturi de 26^{0}C, mutantele *def* se caracterizează prin petale sepaloide și stamine carpeloide, iar la 15^{0}C dezvoltarea florilor este normală, ca la tipul sălbatic.(8) O altă mutantă este GLOBOSA, iar în cercul C suferă mutație gena PLENA.

STYLOSA și FISTULATA sunt două mutante implicate în organogeneza florală, la *Antirrhinum.* Acestea controlează dezvoltarea meristemelor florale, precum și identitatea de organ a genelor implicate în dezvoltarea florii. Cele două gene *sty* și *fis* sunt parte din mecanismele care împiedică expresia ectopică a funcției C, în periant, la florile tipului sălbatic.(7)

Tot la *Antirrhinum majus* au fost identificate mutante de reglare a dezvoltării florale, CHORIPETALA și DESPENTEADO, dar și gene care mediază degradarea florală FIMBRIATA.(6)

7. UN NOU MODEL AL IDENTITĂȚII ORGANELOR FLORALE

Este vorba de al patrulea model care încearcă să explice cum diferite combinații ale genelor homeotice florale (sau produșii lor genici) specifică identitatea organelor florale, fără referire la „funcțiile homeotice florale“.

Acest model sugerează că patru combinații diferite a patru proteine homeotice diferite determină identitatea a patru organe florale diferite. Pe baza acestui model se explică identitatea celor patru organe: sepale, petale, carpele și stamine, ignorând pentru simplificarea explicației ovulele și organele externe. Pentru aceasta a fost nevoie de combinații unice ale genelor homeotice sau ale proteinelor.

La *Arabidopsis,* aceste combinații se bazează pe formarea a patru complexe proteinice diferite. Primul, sepale: AP1-AP1-?-?; al doilea, petale : AP1-AP3-PI-SEP, al treilea, stamine: AP3-PI-AG-SEP, iar al patrulea, carpele: AG-AG-SEP-SEP.(prin ? se notează componentele necunoscute) (fig4).

Aceste complexe proteinice, reprezintă factori transcripționali care pot exercita funcții prin specificarea legării la promotorii genelor țintă, care sunt activate sau represate pentru specificarea dezvoltării de organe florale cu identități diferite.(20)

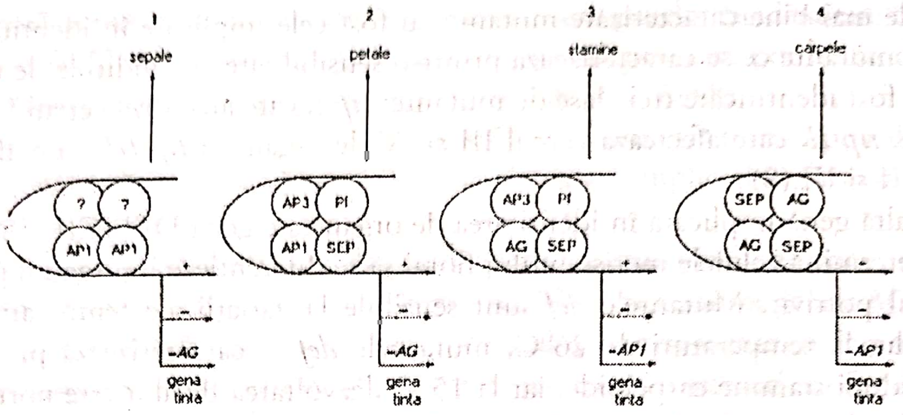


Fig. 4 — „Al 4-lea model“ al identității organelor florale la *Arabidopsis*. Acest model sugerează că patru combinații diferite a patru proteine homeotice florale determină identitatea a patru organe florale diferite. Aceste complexe proteinice, care sunt de fapt factori transcripționali, pot exercita funcția lor prin specificarea legării la promotori a genelor țintă, care sunt fiecare activate (+) sau represate (-).

Specificarea selecției genelor țintă poate fi realizată prin patru complexe, avînd afinități diferite de legare prin împerecheri la diferite secvențe ADN (probabil *CarG-boxes*) și prin distribuția caracteristică a acestor împerecheri de secvențe, în regiunea promotor a diferitelor gene țintă.

Antagonismul între funcțiile A și C în modelul clasic ABC poate fi explicat prin faptul că complexele proteinice care conțin AP1 represează expresia genelor AG, iar complexele care conțin AG represează genele AP1. Aceste interacții pot fi, de asemenea, considerate indirecte.

Toate proteinele homeotice florale ale domeniilor MADS „clasice“ de la *Arabidopsis* (AP1, AP3, PI, AG) pot interacționa „in vitro“.

Studii recente au demonstrat că complexele proteinice ale domeniilor MADS interacționează direct. De exemplu, Egea-Cortines și colaboratorii (21) raportează interacția directă, la *Antirrhinum*, între genele cu identitate pentru meristemele florale (SQUAMOSA) și genele DEF și GLO, din cercul B. Această interacție este necesară pentru stabilirea filotaxiei cercului organelor florale, pe de o parte, iar pe de alta, aceste interacții au loc la nivel proteinic, unde DEF, GLO și SQUA formează complexe multimerice. Afinitatea de legare a ADN la aceste complexe diferă prin dimeri individuali. Autorii sugerează un model în care aceste complexe proteinice sunt în realitate proteine tetramerice, compuse din heterodimerul DEF-GLO și homodimerul SQUA-SQUA. În acest tetramer, dimerii DEF-GLO și SQUA-SQUA recunosc diferite secvențe ADN, numite CarG-boxes (elemente de secvențe ADN), CCA- (bogate)GG.

Dacă formarea acestor complexe va fi conservată la diferite specii de plante cu flori, este foarte ușor de explicat când anumite proteine de la *Arabidopsis,* de exemplu, AP1 și AP3, interacționează in vitro, dar nu formează dimeri de legare ADN.

Astfel, caracterizarea complexelor multimerice a proteinelor MADS poate reprezenta un punct în înțelegerea interacției între genele homeotice florale.(21)

8. CARACTERISTICI GENERALE ALE GENELOR HOMEOTICE

1. Se consideră că genele homeotice conferă fiecărei celule o memorie a organelor pe care le va forma. Această memorie se poate realiza prin autoreglarea genelor respective.

2. Genele homeotice sunt autonome, din punct de vedere al acțiunii lor. O celulă se va comporta în acord cu genotipul său homeotic indiferent de genotipul celulelor înconjurătoare.

3. O celulă are nevoie de o informație de poziție pentru a răspunde unui semnal homeotic. Se consideră că celulele ce exprimă aceleași gene homeotice, în regiuni diferite ale embrionului se pot comporta diferit, în următoarele circumstanțe: proteinele homeotice sunt sintetizate în concentrații diferite, în fiecare tip celular, realizarea de combinații diferite ale proteinelor homeotice, fiecare combinație e caracteristică fiecărei celule, existența unor forme moleculare diferite ale proteinelor homeotice, fiecare formă fiind forma caracteristică unei celule dintr-o anumită poziție. Când aceste forme proteinice sunt funcțional transcripționale, ele pot să controleze diferit mai multe gene sau afectează diferit aceeași genă.

4. Genele homeotice controlează identitatea segmentelor embrionare.

5. Se menține memoria celulelor în diferite segmente sau parasegmente embrionare.

CAPITOLUL XVI

ELEMENTELE TRANSPOZABILE ȘI CONTRIBUȚIA LOR ÎN EVOLUȚIA GENOMULUI PLANTELOR

1. GENERALITĂȚI

Elementele transpozabile au fost prima dată descoperite în anii '50 ai secolului al XX-lea la plante, de către Barbara McClintock, descoperire pentru care avea să primească Premiul Nobel, abia în anul 1983. Denumite inițial elemente de instabilitate genomică, asemenea entități s-au dovedit a juca la plante un rol major în evoluția genomului acestora. Toate tipurile de elemente transpozabile pot fi prezente la toate speciile de plante, dar contribuția lor cantitativă și calitativă este diferită.

Inserția elementelor transpozabile în cromozom are efect reglator asupra activității genetice din imediata vecinătate a punctului de inserție.

Elementele genetice transpozabile sunt segmente ADN care își pot schimba poziția în cadrul genomului prin excizie și reinserție pe același cromozom sau pe unul diferit.

2. TIPURI DE ELEMENTE TRANSPOZABILE

Toate elementele transpozabile au două proprietăți de bază:

1. capacitatea de a se muta din loc în loc, la nivelului genomului, desemnate elemente mobile ale ADN-ului;

2. capacitatea de a amplifica numărul de copii în genom, pe calea transpoziției.

Primele elemente transpozabile au fost detectate la porumb, de către Barbara McClintock, în urma analizei fenomenului de instabilitate somatică, datorită căruia apăreau pete de culoare pe frunze, tulpini, inflorescențe, endospermul boabelor.

Este vorba de 2 tipuri de elemente de control și anume:

a) elemente de control receptoare;

b) elemente reglatoare = unități de transpozare.

Când sunt integrate într-un locus cromozomal, elementele de control produc o mutație la acel locus, iar când sunt excizate, gena suferă o reversie la funcția sa normală. Alteori, la integrare, se poate produce o anumită pigmentație a cariopsei, iar la excizie se produce așa numitul „fenotip de variegare".

Toate elementele transpozabile prezintă câteva trăsături comune:

- prezintă repetiții inversate (IR) de lungimi variabile la ambele capete;
- la integrare determină duplicarea secvenței țintă (< 10pb);
- realizează o transpoziție conservativă (excizie și reintegrare);
- inserția într-o genă inactivează funcția genei, iar excizia duce la revenirea genei la forma normală activă.
- cuprind elemente *reglatoare, autonome;*
  receptoare, neautonome;
- pot fi active sau inactive;
- transpozonii produc mutații care pot determina fenotipuri nule, fenotipuri active sau fenotipuri intermediare.

La plante au fost identificate mai multe clase de elemente transpozabile:

-transpozonii TIR- repetiții inverse terminale.

-*retrotranspozoni* virali

-retrotranspozoni non-virali.

La porumb, cele mai întâlnite elemente transpozabile sunt elementele **Ac / Ds** (*activator / dissociator*), **Spm / Dspm**,(En / I), elementul **Mutator,** dar și elementul **Tam** întâlnite la gura leului (1,2). Aceste elemente au mărimi diferite, de la câteva sute de baze la 10Kb.

Elementele *Ac* au lungimea de 4,6Kb, codifică pentru elemente unice, având o abundență destul de scăzută. ARNm de 3500 ribonucleotide poartă mesajul genetic pentru un polipeptid de 807 aminoacizi, prezentând 5'-UTR de 650 ribonucleotide. La capete, terminațiile invers repetate imperfecte au lungimea de 11 bp.

Elementele Ds prezente la porumb sunt localizate pe brațul scurt al cromozomului 9. La nivelul acestui situs cromozomul se rupe în 2 segmente libere — un segment acentric scurt și unul cu centromer- lung. Prin fuziunea brațelor libere ale cromatidelor surori se produce o cromatidă dicentrică și un fragment acentric care se poate pierde, determinând deleția cromozomului.

Fragmentul acentric deține un corp picnotic în citoplasmă și ulterior dispare. Elementul *Ds* poate suferi transpozare și în alți cromozomi sau alte segmente ale cromozomului 9.

Elementele *Ds* și *Ac* sunt de natură heterocromatică.

Tot la porumb s-a descris elementul **modulator=Mp,** cu localizare lângă gena P, responsabilă de pigmentația pericarpului și mătăsii. Elementul modulator poate suferi transpoziții pe cromozomul 10, unde se asociază cu alela nestabilă R. Și transpoziția acestor elemente poate produce fragmentarea cromozomului.

Aceste elemente modulatoare au fost detectate și la alte specii de plante cum ar fi *Antirrhinum majus*, unde s-au descris loci mutabili = gene aflate sub controlul altor gene și care sunt programate la un moment dat al dezvoltării să sufere mutații direcționate sub incidența interacției cu elementele de control. Această schimbare genică se numește paramutație (consecința interacției genice).

Tot la plante au fost identificate și elemente transpozabile mici, adevărate elemente în miniatură, elemente ce prezintă repetiții inversate, numite **MITE** (*miniature inverted repeat transposable element*).(3,4)

Elementele transpozabile prezintă la capete terminații invers repetate, TIR cu mărimi cuprinse între 11bp la *Ac/Ds* și câteva sute de baze la elementul *Mutator*, alături de elemente imperfect repetate între primele 500 de baze și capete care joacă un rol important în activarea tuturor elementelor transpozabile.(figura 1).

O familie de elemente transpozabile ADN este definită ca fiind de fapt secvențe TIR. Aceste familii de repetiții inversate împreună cu alte elemente codifică pentru anumite enzime numite transpozaze care au rolul de a recunoaște familia TIR.

Retroelementele, numite încă elementele transpozabile ARN, sunt întâlnite din abundență la plante. La porumb acestea reprezintă 70% din ADN nuclear. Toate aceste elemente sunt reverstranscrise.(5)

La plante au fost descrise 5 tipuri de retroelemente.

O clasă de elemente retrotranspozabile este clasa **LINE**-elemente lungi de spațiere. Elementele LINE codifică pentru proteinele *gag* și polimerazice (*pol*) precum și pentru enzime cum ar fi transcriptaze. Funcția *pol* este de a facilita reverstranscrierea LINE ARN în ADN, când o endonuclează ce codifică pentru aceasta este probabil asociată cu integrarea în genom.(7) Inserturile LINE sunt flancate de duplicații directe scurte ale ADN țintă.

Aproape toate retroelemetele conțin elemente lungi repetitive sau LTR.(6) Elementele lungi de spațiere, LTR, codifică pentru funcția de integrare, adică o *integrază* care facilitează încorporarea produșilor circulari ai reverstranscrierii în cromozom.(figura 1)(8)

Două clase de LTR au fost descrise (numite după primii reprezentanți, observați la *Drosophila*) și se numesc ***gypsy*** și ***copia***, care sunt diferite în poziția de integrare și codifică pentru polipeptide.

O clasă majoră de retroelemente sunt elementele **SINE** - elemente mici de spațiere - elemente nucleare de integrare, care deși sunt destul de rar întâlnite la plante, au fost bine investigate. Ele au între 100-300 bp ca mărime și par a fi derivate prin revestranscrierea produșilor ARN polimerazei III.

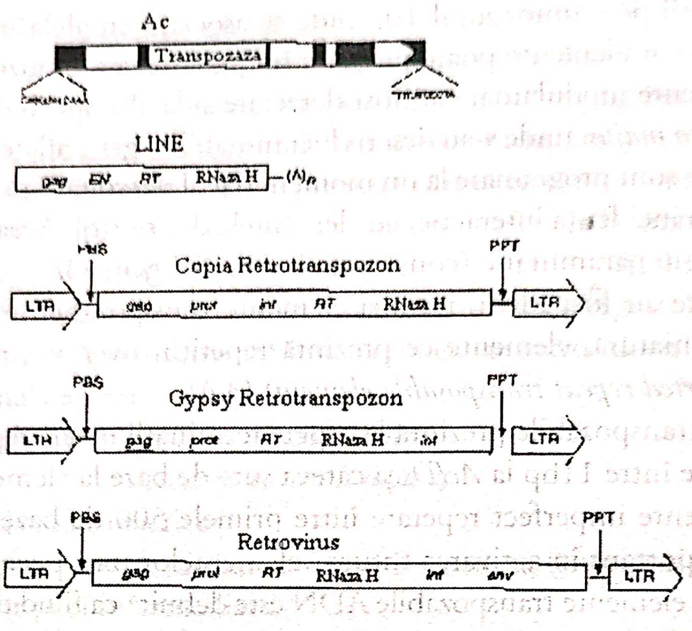

Ac
Transpozaza
LINE
gag EN RT RNaza H
(A)n
PBS
PPT
Copia Retrotranspozon
LTR
gag prot int RT RNaza H
LTR
PBS
PPT
Gypsy Retrotranspozon
LTR
gag prot RT RNaza H int
LTR
PBS
PPT
Retrovirus
LTR
gag prot RT RNaza H int env
LTR

Fig. 1 — Structura elementelor mobile.

3. ELEMENTELE TRANSPOZABILE ȘI EVOLUȚIA STRUCTURII GENOMULUI

Din punct de vedere cantitativ, este ușor de spus că elementele transpozabile sunt factori semnificativi în determinarea structurii și complexității genomului plantelor. În cele mai multe cazuri, acestea sunt aceleași cu genomul.

Cu toate astea, elementele *Ds* de la porumb, deși sunt rare, potențialul lor de rearanjare în genom este excepțional.(9,10)

Un rezultat evident al activității elementelor transpozabile este amplificarea mărimii genomului. Date recente sugerează că aceste elemente alcătuiesc în majoritate genomul plantelor.

Elementele transpozabile reprezintă ele însele un agent care determină silențierea genică. De exemplu, la grâul haploid, pierderea expresiei gluteinei de la locusul Glu-1 se datorează inserției retrotranspozonului de 8Kb ce codifică pentru această regiune.

Nefuncționarea genelor pentru nitratreductaza de la tutun se datorează inserției unei copii a unui retrotranspozon numit Tnt 1.

În ceea ce privește activitatea elementelor transpozabile, acestea pot duce la alterări ale structurii genomului, pe de o parte (tabel1) și ale genelor, pe de alta (tabel2).(11)

Toate rearanjamentele cromozomale, deleții, inversii, duplicații și translocații sunt asociate cu elementele transpozabile. Structura genelor, numărul și paternurile de răspîndire cu alte secvențe sunt determinate, în cea mai mare parte, de elementele transpozabile.(12)

În majoritatea cazurilor, elementele transpozabile sunt responsabile de variația structurii cromozomilor și de evoluția acestora depinde numărul și tipul de elemente transpozabile care sunt prezente, iar aceste caracteristici pot să difere semnificativ între numeroasele specii de plante.(13,14,15)

Tabel 1. Alterarea genomului cauzată de elementele transpozabile

Activitatea elementelor	Rezultat
Transpoziție	Creșterea numărului de copii ale elementelor transpozabile
Transpoziție	Creșterea mărimii genomului Structură citogenetică largă
Transpoziție	Crearea de pseudogene cu număr scăzut de introni
Transpoziție	Mutare genelor sau segmentelor în alte regiuni, amplificarea regiunii
Rupturi cromozomale	Rearanjamente cromozomale, deleții, inversii, duplicații, translocații
Recombinări ectopice	Rearanjamente cromozomale

Tabel 2. Alterări ale genelor cauzate de elementele transpozabile

Activitatea elementelor	Rezultat
Transpoziție	Inactivare genelor prin inserții
Transpoziție	Crearea de noi segmente în cadrul genelor care pot servi ca material viu pentru evoluția unei noi funcții genice
Transpoziție	Alterarea genelor reglatoare
Transpoziție	Crearea de noi introni în gene
Transpoziție	Asamblarea de noi gene prin componente purtate de un element sau de elemente
Excizie	Schimbări mici în segmente locale; deleții sau inserții mici

În mod obișnuit, elementele genetice transpozabile nu sunt active (ex. *Ac* transpozează cu frecvență de câteva procente în descendență). Frecvența transpoziției crește în cazul unor anumite „șocuri genomice“ cum ar fi, de exemplu, cultivare in vitro. La plante, restructurările genomice apărute ca răspuns la modificări ale mediului sunt foarte importante, deoarece asigură plasticitatea genomului necesară adaptării.

De exemplu, sunt cunoscute efectele dăunătoare ale radiațiilor ultraviolete asupra polenului de porumb. La o depleție a stratului de ozon de 33%, expunerea la radiații poate activa transpozonii *Mu*-Mutator, inițial imobili. Reactivitatea spontană a exciziei somatice este rară, cu o frecvență $<10^{-4}$. Iradierea polenului timp de trei minute a reactivat excizia elementelor *Mu*, la majoritatea plantelor studiate (7 din 19, în generația F1, la plante inactive). Chiar în generația F3, expunerea la UVB este de 14 ori mai eficientă decât încrucișarea cu o plantă *Mu* activă. Dublarea UVB terestru >290nm, este citotoxică pentru polen, crescând frecvența mutațiilor, dar nu îndeajuns pentru a pune probleme agriculturii.

Activarea elementelor transpozabile criptice ar putea crește rata mutațiilor. Majoritatea transpozonilor sunt transcripționali inactivi și imobili dar, în anumite situații, pot cauza multe mutații spontane, la porumb și la alte organisme.

Elementele transpozabile sunt instrumente foarte utile pentru identificarea și izolarea de gene, inclusiv la specii la care au sisteme de elemente genetice transpozabile bine caracterizate (gura leului, *Arabidopsis thaliana*), prin introducere de transpozoni heterologi.

Elementele transpozabile sunt considerate agenți mutageni biologici, deoarece au capacitatea de a modifica structura și expresia genelor lângă și în interiorul cărora se inseră. Ele asigură recombinarea genetică nelegitimă. Prin amplificarea și dispersia lor, prin rearanjamentele mediate de inserție și excizie, elementele transpozabile constituie un mecanism important pentru evoluția genomului nu numai la plante, ci și la alte organisme ce posedă astfel de elemente (bacterii, viermi, insecte).

CAPITOLUL XVII

HETEROZOMI LA PLANTE

1. INTRODUCERE

Reproducerea sexuată cu trăsătura ei esențială recombinarea genetică, are loc în organismele *eusexuale*, în care se petrec toate procesele care implică atât meioza, cât și fecundarea. Organismele eusexuale manifestă o alternanță regulată a meiozei și cariogamiei (fuziunea nucleilor gameților sau *singamia)* care constă în unirea gameților femeli și masculi în timpul fecundării, având ca rezultat formarea zigotului.

Alternanța meiozei (reducerea numărului de cromozomi la jumătate și formarea gameților cu număr haploid de cromozomi, (n) cu singamia (unirea nucleilor gameților și apariția nucleului diploid al zigotului (2n) determină succesiunea haplofazei și diplofazei, în cadrul ciclului vital al organismelor eusexuale.

Dezvoltarea cercetărilor de citologie în ultimele decenii ale secolului al-XIX-lea și, în special, descoperirea cromozomilor de către Waldeyer, în anul 1888, au reprezentat condițiile de bază în formularea unor teorii științifice a determinării sexului la organismele dioice.

Studiul intensiv al cromozomilor în timpul spermatogenezei la unele insecte (în special la ploșnita *Pyrochorys apterus*), i-a permis biologului H. Henking , în anul 1891, să descopere faptul că spermatozoizii sunt heterogeni în privința numărului de cromozomi. Astfel, el a stabilit că jumătate dintre spermatozoizi au 11 cromozomi, iar cealaltă jumătate, au câte12 cromozomi, în timp ce toți gameții feminini au câte 12 cromozomi. H. Henking nu a explicat semnificația acestui corpuscul suplimentar care diferențiază gameții masculi și pe care el l-a numit cromozom X sau **idiocromozom**, iar T. H. Montgomery, în anul 1904, l-a numit

heterocromozom, spre deosebire de restul cromozomilor din cariotip denumiți, tot de el, **autozomi**. Astăzi este mult mai utilizat termenul de *heterozomi*, pentru cromozomii de sex.

Descoperirea faptului că idiocromozomul nu are întotdeauna o pereche morfologic identică a fost confirmată de către citologul E.B. Wilson și colaboratoarea sa N. M. Stevens, prin cercetările efectuate la diverse specii de insecte din genul *Protenor*, pe baza cărora au adăugat probe noi, incontestabile, la concretizarea ideii despre rolul cromozomilor în determinarea sexului la organismele dioice și la demonstrarea faptului că organismele unisexuate se diferențiază pe baza unui mecanism cromozomal.

În anul 1906, Wilson numește cromozomii implicați în diferențierea sexelor, **cromozomii de sex**.

Studiul comparativ al determinismului genetic al sexelor, la specii aflate în diferite etape ale evoluției, arată că la organismele inferioare, sexele manifestă o mare labilitate, ele fiind influențate de o multitudine de factori exogeni și endogeni. În schimb, la organismele superioare, sexele au dobândit o stabilitate mai mare, mecanismul cromozomal asigurând cu fidelitate păstrarea raportului dintre sexe (sex-ratio), fenomen de o mare însemnătate biologică.

Cromozomii de sex sunt diferiți unul de altul, atât ca mărime, structură și formă, cât și din punct de vedere genetic. Studiul comparativ al determinismului genetic al sexelor la diferite grupe de organisme a arătat că heterozomii au apărut devreme, în cursul evoluției, printr-un proces de diversificare a unei perechi de autozomi. Transformarea acestei perechi de autozomi în cromozomi de sex a reprezentat un moment de o deosebită importanță în procesul de evoluție a viețuitoarelor, întrucât, cu ajutorul heterozomilor, se poate realiza cu mare precizie un raport constant între cele două sexe.

Inițial, cromozomii de sex existau sub forma unei perechi de autozomi, nediferențiați genetic și morfologic, care însă, conțineau gene majore, deosebit de importante pentru viața organismelor. Pe măsură ce unul dintre cromozomii sexului, notat cu Y, s-a transformat într-un cromozom diferit de perechea sa, a pierdut o parte importantă din rolul său genetic, de obicei, reducându-se ca mărime și conținând numai un număr redus de gene. Din această cauză, cromozomul X, rămas intact, a trebuit să mențină genele majore ale speciei respective și să le poată manifesta în stare hemizigotă.

Cromozomii de sex la plantele superioare au fost pentru prima dată descriși de către Blackburn (1923) și Winge (1923), la *Melandrium* și *Humulus*; de către Kihara și Ohno (1923) la *Rumex acetosa* și de către Santos (1923), la *Elodea.*

Blackburn (1923) a investigat genul *Lychnis,* iar Strasburger, specia *Melandrium rubrum.*

La *Lychnis alba* s-a observat că în afară de cei 24 de cromozomi din celule somatice, doi sunt mai mari decât restul. La plantele femele, acești doi cromozomi apar a fi asemănători, pe când la masculi, cei doi cromozomi diferă unul de altul, ca formă și dimensiune.

Numeroase plante dioice nu au cromozomi de sex distincți. Multe din aceste plante au cromozomi foarte mici și astfel, recunoașterea perechilor heteromorfe nu este întotdeauna sigură.

La plantele angiosperme, dimorfismul sexual (dioicismul) cuprinde un număr mic de specii, printre care *Melandrium album, Cannabis sativa, Vitis vinifera, Humulus lupulus, Bryonia dioica, Carica papaya, Fragaria elatior* etc. La plantele gimnosperme, dioicitatea apare ca un fenomen obișnuit.

La plantele hermafrodite, organele sexuale mascule și femele sunt prezente în aceeași floare (de exemplu, orzul, grâul, ardeiul, mazărea etc. — autogame; secara, lucerna, mărul etc. — alogame). În cazul speciilor monoice, organele sexuale mascule și femele sunt separate în flori diferite, situate pe aceeași plantă (de exemplu, porumbul, castravetele, etc.).

La speciile dioice, organele sexuale mascule și femele sunt separate și situate pe plante diferite (de exemplu *Melandrium album, Cannabis sativa* etc.)

Sexul subdioic se manifestă la specii dioice, la care în anumite condiții de mediu apar și plante cu flori hermafrodite sau monoice (de exemplu *Asparagus officinalis, Cannabis sativa, Mercurialis annua* etc.).

Sexul subandroic, respectiv subginoic, se manifestă la speciile dioice, primul tip, la plantele mascule , al doilea, la plantele femele.

La plante, în determinarea sexului există o variație mare de mecanisme sexuale.

Tabel 1 — Specii de plante la care au fost evidențiați cromozomi heteromorfici ai sexului (după Westergaard, 1958)

SPECIA	NUMĂRUL DE CROMOZOMI 2n	CONSTITUȚIA SEXULUI FEMEL	CONSTITUȚIA SEXULUI MASCUL
Canabis sativa	20	XX	XY
Humulus lupus	20	XX	XY
H. lupus var. *cordifolius*	20	$X_1X_1X_2X_2$	$X_1Y_1X_2Y_2$
H. japonicus	16 ♀ 17 ♂	XX	
Rumex sub-genus *acetosella*			
R. angiocarpus	14	XX	XY
R. tenuifolius	28	(XX) XX	(XX) XY
R. acetosella	42	(XXXX) XX	(XXXX) XY
R. graminifolius	56	(XXXXXX) XX	(XXXXXX) XY
R. sub-genus *acetosa*			
R. hastatulus	8 ♀ 9 ♂	XX	XY_1Y_2
R. acetosa	14 ♀ 15 ♂	XX	XY_1Y_2
R. paucifolius	28	(XX) XX	(XX) XY
Melandrium album	22	XX	XY
M. rubrum	22	XX	XY
Asparagus officinalis	20	XX	XY sau YY

Tabel 2 — Principalele tipuri de sex la plante (după Crăciun și colaboratorii, 1991):

TIPUL SEXULUI	TIPUL ȘI DISPUNEREA FLORILOR	SPECII REPREZENTATIVE
Hermafrodit	Flori hermafrodite	*Pisum sativum*-autogamă *Secale cereale*- alogamă
Monoic	Flori ♀ și ♂	*Zea mais*
Dioic	Plante fie cu flori ♀ fie cu flori ♂	*Melandrium album*
Subdioic	Plante fie cu flori ♀ fie cu flori ♂ dar ocazional, și cu flori hermafrodite sau cu plante monoice	*Asparagus officinalis*
Subandroic	Plantă masculă la o specie dioică, la care unele flori sunt fie ♀, fie hermafrodite	
Subginoic	Plantă femelă la o specie dioică, la care unele flori sunt fie ♂, fie hermafrodite	
Ginodioic	Specii la care apar regulat atat plante ♀ cât și plante hermafrodite într-un raport aproximativ de 1:1	*Cirsium oleraceum*
Andromonoic	Specii la care toate plantele au atât flori ♂ cât și flori hermafrodite	
Ginomonoic	Specii la care toate plantele au atat flori ♀ cât și flori hermafrodite	

2. MECANISMELE DETERMINĂRII SEXULUI LA PLANTELE DIOICE

Pe baza descoperirilor privind cromozomii sexului la diferite grupe de specii de plante dioice au fost descrise mecanismele cromozomale implicate în determinarea sexului.

Acestea sunt:

Sex femel cu cromozom X și sex mascul cu cromozom Y

Y. C. E. Allen (1919) a studiat cromozomii la specia de mușchi *Sphaerocarpus donnellii* ce prezintă o alternanță de generații asexuată (2n), reprezentată de sporofit, și sexuată (n), reprezentată de gametofit. Sporofitul are 2n=16, din care 7 perechi de autozomi și o pereche de heterozomi diferiți ca dimensiuni și notați X și Y. În urma meiozei rezultă 4 spori haploizi, din care 2 conțin câte un cromozom X și devin gametofiți femeli, iar ceilalți doi conțin câte un cromozom Y și devin gametofiți masculi. În felul acesta, indivizii femeli haploizi conțin heterozomul X de dimensiuni mari, iar cei masculi conțin heterozomul Y de dimensiuni mai mici. Sporofitul este diploid și prezintă ambii heterozomi (XY).

Sex mascul heterogametic XY, sex femel homogametic XX

Un asemenea mecanism este prezent la *Melandrium album, M. rubrum, Cannabis sativa, Rumex angiocarpus, Humulus lupus* (unele varietăți). Tot după acest mecanism se realizează determinarea sexului și la speciile de *Populus, Salix,* ca și la *Urtica dioica, Elodea canadensis* ș.a., precum și la gimnosperme (*Ginko, Taxus, Juniperus* s.a.). Formula cromozomală pentru sex la aceste specii este similară tipului Drosophila.

Expresia sexului la *Melandrium* depinde exclusiv de determinanții masculini prezenți în cromozomul Y. Influența cromozomului Y este suficientă pentru a supresa potențialele femele cu trei cromozomi X și patru seturi autozomale.

S-a demonstrat că doi cromozomi Y (XXXXYY) aproape dublează efectul masculinizant. Doi cromozomi Y balansează efectul la 4 cromozomi X și rezultă o majoritate de plante mascule. Cromozomul Y apare a avea elemente care să potențeze sexul mascul.

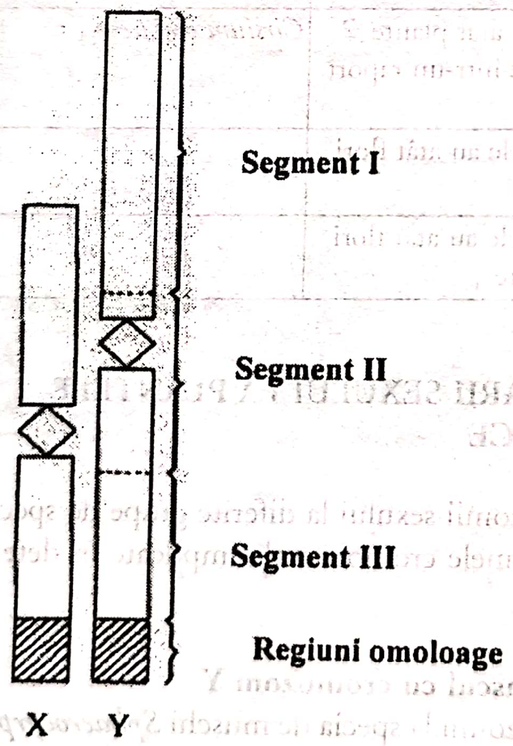


Fig. 1 — Cromozomii sexului la *Melandrium album* (după M. S. Clark și W. J. Wall, 1996).

La *Melandrium*, cromozomul Y prezintă segmentul I ce conține gene supresor femele, segmentul II ce conține gene care inițiază dezvoltarea anterei și segmentul III cu gene care controlează ultimele stadii ale dezvoltării anterale.

Mecanismul XY ♂ și XX ♀ determină sexul și la speciile poliploide ale genului *Rumex* (x=7). Acestea posedă pentru fiecare genom 6 autozomi plus un heterozom. Astfel, în celulele somatice ale speciei tertraploide *R. tenuifolius* (2n=4x=28) se găsesc 4 seturi a 6 cromozomi, plus (XX)XX ♀ și respectiv, (XX)XY ♂. La specia hexaploidă *R. acetosella* (2n=6x=42) se găsesc 6 seturi a 6 autozomi, plus (XXXX)XX ♀, și respectiv, (XXXX)XY ♂, iar la specia octoploidă *R. graminifolius* (2n=8x=56) se găsesc 8 seturi a 6 autozomi, plus (XXXXXX)XX ♀ și respectiv, (XXXXXX)XY ♂.

La speciile subdioice *Vitis vinifera, Mercurialis annua, Asparagus officinalis* și posibil, la *Spinacea oleracea,* sexul mascul heterogametic are structura XY. La aceste specii, sexul heterogametic poate dezvolta și flori subandroice, care pot contribui la apariția unor indivizi masculi homozigoți XYY viabili. La *Asparagu,* asemenea indivizi se pot obține în urma autopolenizarii unei plante subandroice (XY), care poate segrega în raportul 1 XX ♀ : 2 XY ♂ : 1 YY ♂ . La *Melandrium, Humulus* și *Rumex* nu au fost observați indivizi YY.

Sex mascul heterogametic XO ♂, sex femel homogametic XX ♀.

Acest mecanism este prezent la unele specii din genul *Dioscorea.*

Sex mascul heterogametic cu extracromozomi XY_1Y_2 ♂, sex femel homogametic XX ♀

Acest sistem apare la *Humulus japonicus* , *Rumex hastatulus, R. acetosa.* La aceste specii, cele două sexe au un număr diferit de cromozomi, și anume: 2n, la sexul femel și 2n+1, la sexul mascul. Deci, sexul heterogametic (mascul) posedă 2

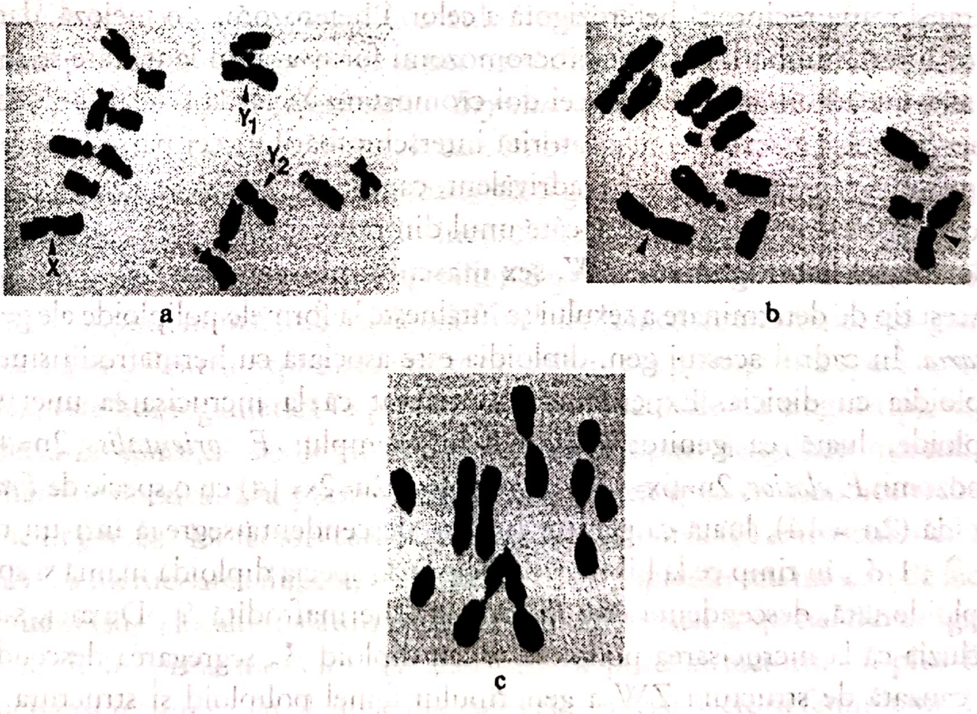


Fig. 2 — Cromozomii sexului la *Rumex acetosa* (a) Sex mascul – săgețile indică cromozomii sexului X, Y_1 și Y_2; (b) sex femel – săgețile indică cei doi cromozomi X; (c) trivalentul de sex (după Parker și Clark, 1991).

cromozomi Y și un singur X (XY_1Y_2), iar sexul homogametic, o pereche de cromozomi X(XX).

La *Rumex acetosa*, cromozomii sexului mascul XYY formează un trivalent în diviziunea celulară meiotică și întotdeauna segregă regulat, cu cromozomul X migrând spre un pol și cei doi cromozomi Y, spre celălalt pol. Experimentele au arătat că doar un sfert din cromozomul X este implicat în determinarea feminității, în ciuda dimensiunii sale mari, restul fiind inactiv. Pentru fertilitatea polenului este esențial doar cromozomul Y. Determinarea sexului la *Rumex* poate fi influențată de prezența extraautozomilor, de exemplu, în triploizi.

Prin infecția cu ciuperca *Ustilago violaceea*, uneori, femelele pot dezvolta antere. Probabil, ciuperca este producătoare a unui hormon de sex, a cărui genă, în mod normal, se găsește situată și în cromozomul Y.

Sex mascul heterogametic cu 4 heterocromozomi $X_1Y_1X_2Y_2$, sex femel homogametic, tot cu 4 heterocromozomi $X_1X_1X_2X_2$.

Acest mecanism este prezent la *Humulus lupulus*, var. *cordifolius* (2n=20, 2n=16 $+X_1X_1X_2X_2$?; 2n=16 $+X_1Y_1X_2Y_2$ ♂). Între heterocromozomi au loc interschimbări care diferențiază sexele. Astfel, sexul mascul nu este numai heterolog pentru perechea de cromozomi XY, ci este, de asemenea, un hibrid structural, rezultat din translocația reciprocă heterozigotă a celor 4 heterozomi. În meioză, datorită acestor interschimbări, cei 4 heterocromozomi formează un lanț, care se separă, migrând întotdeauna la un pol, cei doi cromozomi X, iar la celălalt pol, cei doi cromozomi Y. La sexul femel, datorită interschimbărilor, cei patru cromozomi X formează în meioză un inel cvadrivalent, care în diakineză se separă în câte o pereche (X_1X_2) ce migrează spre câte unul din poli.

Sex femel heterogametic ZW, sex mascul homogametic ZZ.

Acest tip de determinare a sexului se întâlnește la formele poliploide ale genului *Fragaria.* În cadrul acestui gen, diploidia este asociată cu hermafroditismul, iar poliploidia cu dioicia. Experiențele au relevat că la încrucișarea unei specii poliploide, luată ca genitor matern (de exemplu: *F. orientalis,* 2n=4x=28 cromozomi; *F. elatior*, 2n=6x=42; *F.grandiflora*, 2n=2x=14) cu o specie de *Fragaria* diploidă (2n = 14), luată ca genitor patern, descendența segregă într-un raport de 1 ♀ : 1 ♂ , în timp ce la hibridarea reciprocă, specia diploidă mamă și speciile poliploide tată, descendența este în totalitate hermafrodită ♀. De aici, s-a tras concluzia că la încrucișarea poliploid ♀ cu diploid ♂, segregarea descendenței este cauzată de structura ZW a genotipului femel poliploid și structura ZZ a genotipului mascul diploid. Un mecanism ZW ♀ , ZZ ♂ este prezent probabil, și la *Valeriana dioica*.

3. RAPORTUL DINTRE SEXE (SEX RATIO)

În general, la plantele dioice, raportul de segregare în indivizi de sex femel și mascul, este de 1:1. La genuri ca *Bryonia, Melandrium, Mercurialis* și *Spinacia,* descendența este alcătuită din plante femele și plante mascule în proporție de 50%. La alte specii dioice, apare o deviere de la raportul 1 ♀ : 1 ♂, predominând plantele de sex femel. Aceasta se datorează în special faptului că alungirea tuburilor polinice ale grăuncioarelor de polen cu cromozom Y este depășită de tuburile polinice ale grăuncioarelor cu cromozom X. Potrivit unor cercetări (D. Lewis, 1942), proporția plantelor femele este la *Melandrium album*, de 56%, la *Cannabis sativa*, de 58%; la *Humulus japonicus,* de 71%, la *Rumex acetosa,* de 72%. Aceleași cercetări relevă și o excepție, *Silene otites*, la care plantele mascule reprezintă 62%.

În condiții schimbate de mediu, de exemplu, la schimbarea duratei de lumină (zi scurtă, zi lungă și invers), raportul dintre sexe se poate schimba.

4. GENELE SEXULUI

La plantele care formează pe același individ atât organe sexuale femele, cât și organe sexuale mascule, controlul sexului implică unele gene majore. Din acest grup fac parte plantele monoice și hermafrodite.

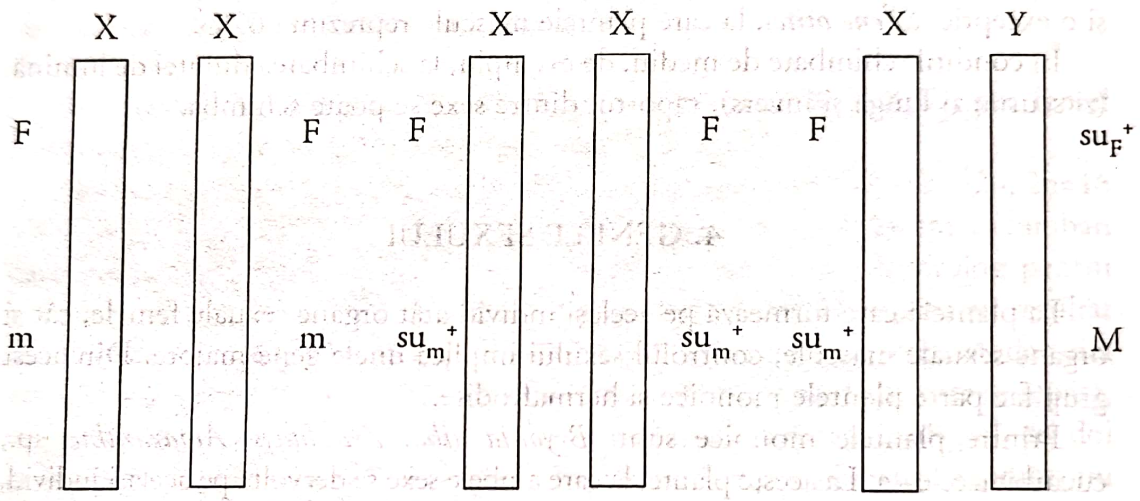
Printre plantele monoice sunt: *Bryonia alba, Zea mays, Amaranthus* sp., cucurbitaceele ș.a. La aceste plante, la care ambele sexe se dezvoltă pe același individ, se poate presupune că formula cromozomală și genele din cele două tipuri de gameți sunt similare. Acest fapt reiese din încrucișarea reciprocă dintre specii dioice și specii monoice. La încrucișarea speciilor *Bryonia dioica* ♀ x *B. alba* ♂, în F_1, Correns a obținut numai indivizi de sex femel, iar la încrucișarea reciprocă, generația F_1 1 ♀ : 1 ♂ . Pentru explicarea acestor rezultate s-a presupus că specia monoică *B. alba,* este homogametică (a produs gameți masculi de un singur tip), în timp ce specia *B. dioica,*de sex mascul, produce două tipuri de gameți masculi, deci este heterogametică. S-a presupus de asemenea, că speciile monoice trebuie să posede în gameții lor factori care favorizează feminitatea (F) și masculinitatea (M sau m). La încrucișarea directă, acești factori sunt supresați sau mascați de factorul feminității (su_F^+, localizat alături de F) din gameții femeli ai speciei dioice (gameții masculi de la specia monoică, în acest caz, au posedat factorul m, plus F). La încrucișarea reciprocă, în plantele mascule care segregă, factorii feminității (F) din specia monoică (♀) sunt supresați de către factorii care favorizează masculinitatea la plantele dioice (su_F^+, factor localizat alături de factorul M, în cromozomul Y) (Westergaard, 1958).

Rezultate asemănătoare s-au obținut și la hibridarea *Acnida tamarisciana* (dioică) și *Amaranthus* sp. (monoică). Astfel, la hibridarea directă: *Ac. tamariscina.* ♀ x *Am. spinosus* ♂, în F_1, toți descendenții erau de sex femel, iar la hibridarea reciprocă: *Am. spinosus* ♂ x *Ac. tamariscina* ♀, în F_1 descendenții segregau în raportul 1 ♀ : 1 ♂.

Harta genetică experimentală a cromozomilor implicați în determinarea sexului la *Bryonia, Amaranthus* si *Acnida.*

Specii monoice
Bryonia alba
Amaranthus ssp.

Specii dioice
Bryonia dioica
Acnida tamariscina



su_F^+ supresează producerea carpelei de către F
su_m^+ supresează producerea anterei de către m
su_m^+ este neeficient față de M din cromozomul Y la speciile dioice.

Spre deosebire de aceste rezultate, ca de altfel, și de cele obținute în hibridarea B. *dioica x B. alba*, hibridarea *Acnida tamariscina* (dioică) ♀ x *Amaranthus spinosus* (monoică) ♂ , rezultatele apar cu totul deosebite. Astfel, la hibridarea *Ac. sp* x *Am. spinosus,* direct și reciproc, în F_1 apar cu precădere indivizi masculi (1-0,8, respectiv 0,93), un număr mic de indivizi monoici (0-0,2 respectiv, 0-0,7) și foarte puțini indivizi de sex femel (circa 1%).

La hibridarea *Ecballium dioicum* ♀ x *E. monoicum* ♂ (M), descendența F_1 este constituită numai din indivizi monoici, iar la hibridarea reciprocă (*E. monoicum* ♀ x *E. dioicum* ♂), descendența F_1 segregă în indivizi masculi și monoici , în raportul 1♂ : 1 ♀ ♀ ♂ ; apare și un număr mic de indivizi de sex femel (cca 1%).

Chiar și ultimele hibridări demonstrează că speciile monoice sunt homogametice, dar raporturile de segregare ale hibrizilor F_1 indică faptul că speciile monoice pot să aibă diferite sisteme genetice în cromozomii implicați în controlul sexului. Astfel, analiza hibridării *Ac. tamariscina* x *Am. spinosus* indică faptul că factorul genetic care favorizează masculinitatea în specia monoică (*Am. spinosus)* nu este supresat de su_m^+ din specia dioică (*Acnida*). Ca urmare, apariția descendenților monoice și a celor femele se datorează fie prezenței unor factori modificatori, fie influenței condițiilor de dezvoltare.

Faptul că la hibridarea directă *E. dioicum* ♀ x *E. monoicum* ♂ se obțin numai plante monoice, se consideră că se datorează prezenței în cromozomul X din specia monoică a genelor dominante M (plus F), care favorizează masculinitatea, în timp ce în cromozomul X din specia dioică se găsește gena masculinizantă m (plus F). La hibridarea reciprocă (*E. monoicum* ♀ x *E. dioicum* ♂) se obțin plante mascule și monoice în raportul 1 ♀ : 1 ♂ , deoarece cromozomul X din forma monoică ♀, care posedă genele M și F, se unește prin singamie, cu cromozomul Y din specia dioica ♂ , care posedă, de asemenea, o genă M , plus supresorul su_F^+, care inhibă gena F.

În florile și inflorescențele plantelor monoice, adeseori, se găsesc rudimente ale organelor sexuale opuse (antere din floarea femela și rudimente de pistile — pistilodii — în floarea masculă). Uneori, aceste rudimente se dezvoltă, determinând formarea de gameți masculi în floarea femelă sau de ovule și stigmate în inflorescența masculă. De exemplu, la porumb, pe inflorescența femelă (știulete) se pot dezvolta flori care produc polen, iar în inflorescența masculă (panicul) pistile și, respectiv, boabe. Aceste anomalii se datorează fie mutației genelor care controlează unul sau altul dintre organele sexuale, fie condițiilor de mediu (lungimea zilei, temperatura în timpul înfloritului ș.a.), care favorizează sau inhibă dezvoltarea unuia sau altuia dintre sexe, respectiv supresia și activarea de gene ale ginogenezei și ale androgenezei în locuri anormale.

5. SEPARAREA GENETICĂ A SEXELOR LA PLANTELE MONOICE

În plantele monoice s-au descoperit gene care pot supresa selectiv dezvoltarea fie a unui tip de organ sexual, fie a celuilalt tip; probabil aceste gene ale sexului controlează sinteza și nivelul auxinelor. D. Lewis (1952) a menționat că la speciile monoice și hermafrodite, ca: *Antirrhinum* sp., *Lathyrus odoratus, Lycopersicon esculentum, Oryza sativa, Prunus persica, Rubus idaeus, Zea mays* ș.a. există gene care supresează formarea staminelor sau a florilor cu stamine, iar la speciile: *Oryza sativa, Pisum sativum, Rubrus idaeus, Zea mays* ș.a. există gene care supresează dezvoltarea pistilelor sau a florilor cu pistile.

Recombinarea locilor responsabili pentru aceste caracteristici poate induce transformarea genotipului unei specii bisexuate, în genotipul caracteristic pentru o specie unisexuată dioică. De exemplu, Emerson (1932) și Jones (1934) au realizat forme dioice de porumb prin recombinarea alelelor normale și mutante implicate în controlul formării organelor florale, la porumbul monoic.

La porumb, alela normala *Ts* sau ts^+ determină formarea unui panicul normal, cu flori mascule. Alelele *ts* , apărute prin mutație spontană, în stare homozigotă inhibă formarea florilor mascule și schimbă paniculul în inflorescență cu flori femele. Gena dominantă *Ba* controlează dezvoltarea inflorescenței femele (știuletelui), în timp ce alelele mutante, în stare homozigotă *baba* supresează formarea știuletelui.

Prin separarea sau unirea acestor alele se poate schimba structura sexuală la porumb, obtinându-se fie plante femele, fie plante mascule. Astfel, se pot obține următoarele genotipuri și fenotipuri:
Ts_2ts_2baba — mascul (panicul normal, fără știulete);
ts_2ts_2baba — femel (pistile în panicul, fără știulete).

Genotipul mascul Ts_2ts_2baba fiind heterozigot pentru locusul ts^+ , la încrucișarea cu genotipul homozigot femel ts_2ts_2baba determină o segregare în F_1 în plante femele și mascule, în raportul de 1:1. Repetarea încrucișării între descendenți determină în continuare o segregare de 1 ♀ : 1 ♂. De exemplu :
P — ts_2ts_2baba (♀) x Ts_2ts_2baba (♂);
F_1 — $^1/_2$ ts_2ts_2baba (♀♀) ♀ $^1/_2$ Ts_2ts_2baba (♂♂).

Dioicizarea plantelor monoice, prin utilizarea diverselor variante ale locilor sexului, poate să prezinte pe lângă importanța teoretică, și una practică. În acest sens, un exemplu elocvent îl reprezintă unele cucurbitacee monoice cultivate, cum sunt castraveții. La aceștia se formează flori mascule și femele pe fiecare plantă. Cercetarea distribuirii florilor femele și mascule pe aceeași tulpină a relevat faptul că în succesiunea apariției tipurilor de flori sunt implicate, alături de mecanisme genetice, și condițiile de mediu . Astfel, s-a stabilit că în condiții obișnuite de mediu, primele flori sunt anormale sau mascule nefuncționale, urmate de flori mascule funcționale și apoi, succesiv, de flori fie femele, fie mascule. Spre treimea superioară a vrejilor, mugurii (nodurile) femeli devin tot mai abundenți, cu ovare tot mai mari, iar în final, apar numai flori femele (majoritatea partenocarpice). În condiții de zi scurtă și temperatură scăzută (în special noaptea), expresia sexului se schimbă spre feminitate (primăvara), iar în condiții de zi lungă și temperaturi mai ridicate, se manifestă tendința de masculinitate (vara). Tot masculinizare se manifestă și în condiții de zi scurtă, sub 8 ore.

Auxinele (în special acidul α-naftalenacetic și acidul β-indolacetic), în concentrația de 0,1%, alterează puternic expresia sexului, în sensul feminizării, în timp ce tratamentul cu gibereline cauzează o puternică tendință masculinizantă (în special în condiții de zi scurtă). Aceste constatări au o deosebită importanță practică. De exemplu, tratarea plantelor femele cu acid giberelic le poate modifica în plante monoice apte pentru înmulțirea prin consangvinizare. Antigiberelinele (retardanții), de tipul clorurei de clorocolină (CCC), inhibă sinteza giberelinelor în plante, favorizând feminizarea. O altă substanță — ethrelul, de asemenea, induce feminizarea.

În privința controlului genetic al sexului, s-a stabilit că la formele monoice de cucurbitacee sunt implicați, în principal, doi loci: *St, st,* și *M, m.* În stare homozigotă, alela *St (StSt),* în prezența alelei *M,* controlează feminizarea și, ca urmare, formele monoice au genotipul *StStMM,* femelele pure au genotipul *ststMM.*

În general, alela *M* este implicată în activarea (în prezența alelei *St*) și represia (în prezența alelei *st*) genelor care controlează dezvoltarea anterelor, cauzând diferențierea florii pistilate. Alela *m,* în stare homozigotă, asigură dezvoltarea secvențială atât a anterelor, cât și a pistilelor. În mugur, prezența alelei *M* determină la începutul organogenezei o bisexualitate potențială, după care are loc dezvoltarea, fie într-o floare masculă, fie una femelă.

Starea heterozigotă, *Stst,* asigură dezvoltarea sexului femel, în condiții de zi lungă și temparatură scăzută, precum și monoicitate normală, în condiții de zi lungă și temperatură ridicată. În general, genotipul *Stst* în hibrizii F_1, rezultați din genitori monoici cu număr mic de noduri pe tulpină, determină feminitate aproape completă, în timp ce, în hibrizii F_1 cu număr mare de noduri pe tulpină, asigură monoicitate.

Schematic, genotipurile și fenotipurile tipurilor de sex, la castraveți sunt:
StStMM — plantă monoică (♀ ♀ ♂);
ststMM — plantă femelă (♀♀);
StStmm — plantă andromonoică (♂ ♀ ♀);
ststmm — plantă cu flori bisexuate sau hermafrodite.

Cercetarea mecanismelor care controlează determinarea și expresia sexului la plante prezintă, prin implicații, un interes deosebit. În primul rând, cunoașterea acestor mecanisme permite să se înțeleagă rolul diferențierii organelor sexuale în realizarea determinismului genetic al numărului de flori, raportul dintre sexe, etc. În al doilea rând, cunoașterea mecanismelor genetice ale sexualității la plante are o importanță uriașă în producerea de sămânță hibridă comercială.

Pentru producerea seminței hibride comerciale, într-o primă fază, prin *backcross,* se transferă ginoicitatea (♀) determinată de genotipul *stst* într-o linie consangvinizată monoică, cu capacitate combinativă specifică ridicată. După 4-6 backcross-uri, plantele heterozigote (plante monoice homozigote se elimină după fiecare backcross) se autopolenizează, pentru a determina segregarea. Dintre segreganți, plantele femele mature se tratează cu acid giberelic, pentru a produce flori mascule în vederea autopolenizării. Apoi, semințele obținute se însămânțează într-un câmp de înmulțire a liniei ginoice, după metoda SIB. Pentru aceasta, unul din trei rânduri de plante se tratează cu acid giberelic pentru masculinizare și producerea polenului). În anul următor se produce sământă heterozis. În acest scop, semințele de pe rândurile următoare ale liniei ginoice se însămânțează altern cu o linie consangvinizată monoică polenizatoare. Se recoltează sământă din fructele dezvoltate pe plantele ginoice, din care, după însămânțare, vor rezulta plante F_1 cu vigoare hibridă (monoice, cu structura *StSt*).

Un mecanism similar poate fi utilizat și la incrucișarea pepenilor verzi pentru producerea semințeі heterozis F_1 triploide (3x = 33 cromozomi). În acest scop, se induce ginoicitate la linia tetraploidă (4x = 44) care apoi, se va încrucișa în câmpul de hibridizare cu o linie monoică diploidă (2x = 22), deoarece polenul haploid (x = 11) este mai activ în singamie cu oosfere diploide (2x = 22). Fructele triploide în număr sporit, mai mari și mai bogate în substanță uscată (în special glucide), sunt lipsite de semințe datorită meiozei anormale.

Curmalul (*Phoenix dactylifera)* este o plantă monocotiledonată aparținând familiei Arecaceae, este un palmier fructifer foarte bine adaptat la regiunile aride și cultivat din cele mai vechi timpuri. Până în prezent, producția de curmale a reprezentat cea mai importantă resursă de alimentație pentru populația sahariană.

Curmalul este o planta dioică, florile mascule și femele sunt situate pe indivizi separați. Într-o populație salbatică, cele două sexe sunt reprezentate în proporții egale.

Într-o cultură productivă, un singur individ mascul produce polen de „bună calitate“, suficient pentru a poleniza 100 de plante femele.

În general, primele inflorescențe apar după 8 — 10 ani. Aceasta fiind durata pentru identificarea sexului.

Se poate utiliza metoda de citometrie în flux pentru determinarea cantității de ADN și compoziția în baze AT și GC și prin dozajul cantității de ADN nuclear se permite ca la anumite specii precum *Jojoba* și *Melandrium album* să se diferențieze sexele.

6. EVOLUȚIA DIVERSITĂȚII SEXUALE LA PLANTE

Florile, organele reproducătoare la angiosperme, sunt mult mai variate decât orice altă structură echivalentă de la oricare alt organism. Datorită acestei variabilități, interesul asupra diversității sexuale la plante are o lungă și venerabilă istorie în biologie. Linnaeus a folosit această variabilitate a structurilor sexuale ca bază în clasificarea sa, Darwin a publicat 3 volume referitoare la biologia reproducerii la plante și Fisher a aplicat principiile geneticii populațiilor pentru înțelegerea evoluției sistemului de reproducere la plante.

Strategii care înlesnesc polenizarea încrucișată (alogamia)

Majoritatea plantelor cu flori sunt hermafrodite, cele mai multe specii producând flori care conțin atât organe sexuale feminine (pistile), cât și organe sexuale masculine (stamine). Aceste structuri sexuale pot fi separate spațial în floare, fenomen cunoscut sub denumirea de **herkogamie,** sau pot funcționa în momente diferite, fenomen cunoscut sub numele de **dichogamie**, reducând astfel posibilitatea autopolenizării.

La speciile heterostile, populațiile sunt compuse din două (distilie) sau trei (tristilie) structuri florale ce diferă una de cealaltă prin poziția în care sunt localizate anterele și staminele în flori. Acest polimorfism sexual a apărut independent, prin intermediul presiunii selective convergente, la ultimele 28 de familii de angiosperme cu polenizare realizată cu ajutorul animalelor, acest polimorfism fiind

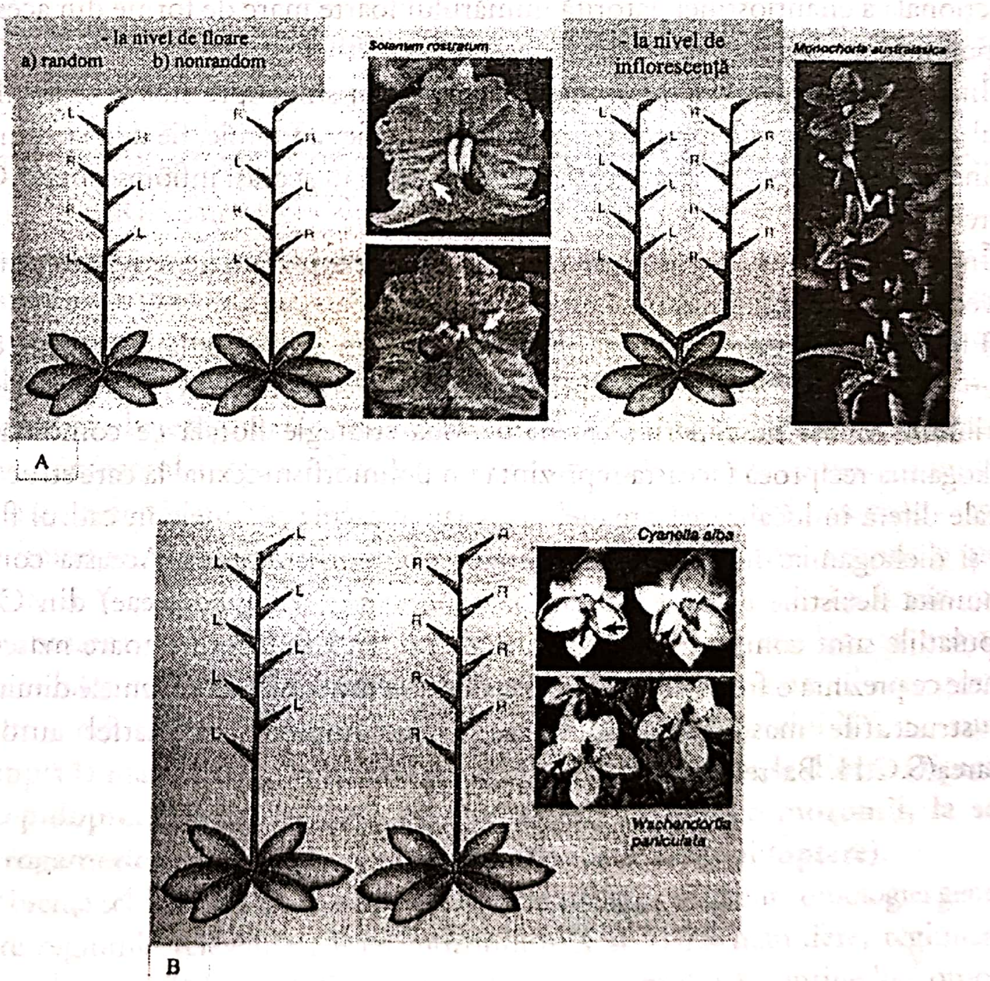

- la nivel de floare
a) random
b) nonrandom
Solanum rostratum
- la nivel de inflorescență
Monochoria australasica
A
Cyanella alba
Wachendorfia paniculata
B
L
R

Fig. 3 — Forme de enantiostilie la plantele cu flori. A – enantiostilie monomorfică; B – enantiostilie dimorfică (după S. C. H. Barrett, 2002).

important în realizarea unei polenizări încrucișate. Plantele heterostile prezintă, de regulă, un sistem de incompatibilitate heteromorfică ce previne autopolenizarea.

Heterostilia este o trăsătură ereditară simplă, controlată de un singur locus dialelic (alela dominantă este cea care controlează distilia) și de doi loci dialelici cu caracter epistatic (alelele dominante guvernând tristilia). La speciile distilice există probabil un „control supergenic" asupra componentelor morfologice și fiziologice, dar, practic, nu este cunoscut mecanismul molecular care determină heterostilia, iar locii care guvernează acest polimorfism nu au fost cartați (Barrett, 2002).

Enantiostilia. Heterostilia reprezintă cel mai bine studiat polimorfism sexual ereditar la plante, însă studiile recente sunt focalizate pe alte tipuri de polimorfisme ale organelor sexuale. Cel mai curios exemplu de polimorfism sexual este enantiostilia, un tip rar de asimetrie direcțională la plante, fiind caracterizat morfologic de flori așezate în „imaginea în oglindă". Este foarte greu de interpretat semnificația funcțională a enantiostiliei datorită numărului foarte mare de forme din acest tip de polimorfism stilat.

În cazul enantiostiliei monomorfice, florile cu stilul spre stânga și florile cu stilul spre dreapta se află pe aceeași plantă, așezate fie randomic, fie după o anumită ordine (fig. 3) sau pot fi separate, dar să se găsească în aceeași inflorescență(S.C.H. Barrett, 2002).

În cazul enantiostiliei dimorfice, indivizii sunt uniformi genetic, din punctul de vedere al direcției stilului.

Flexistilia reprezintă un polimorfism sexual în care populația conține două tipuri de structuri florale ce diferă prin modalitatea temporală de creștere și orientare a stilului. A fost descoperită recent o nouă strategie florală ce combină atât herkogamia reciprocă (aceasta reprezintă un polimorfism sexual la care structurile florale diferă în localizarea organelor sexuale mascule și femele în cadrul florii), cât și dichogamia, în cadrul unui singur polimorfism stilar. Această condiție denumită flexistilie a fost raportată la *Alpinia* ssp (Zingiberaceae) din China. Populațiile sunt compuse din structuri ale organelor reproducătoare mascule și femele ce prezintă o frecvență egală, doar că unele funcționează ca femele dimineața, iar structurile mascule funcționează seara, împiedicând astfel autopolenizarea(S.C.H. Barrett, 2002).

CAPITOLUL XVIII

DIFERENȚIEREA CROMOZOMILOR DE SEX ȘI TRANZIȚIA DE LA HERMAFRODITISM (COSEXUALITATATE) LA UNISEXUALITATE

1. INTRODUCERE

Reproducerea sexuată cu un anumit grad de dimofism al gameților este aproape universală printre eucariote.

Gameții masculi și femeli pot fi produși de un același individ (COSEXUALITATE sau HERMAFRODITISM) sau de indivizi diferiți, separați (DIOICE, GONOCORIE sau UNISEXUALITATE). Cele mai multe specii de animale terestre sunt dioice, pe când **cosexualitatea este larg răspândită printre nevertebrate marine și plantele terestre.** Mecanismele de determinare a sexelor sunt uimitor de diverse. Cel mai obișnuit mod de determinism genetic al sexelor implică existența unor cromozomi ai sexelor, distincți morfologic. Cea mai comună condiție este heterogameția masculă în cadrul căreia masculii prezintă heterozomi adică cromozomi ai sexelor X și Y și homogameția femelelor cu heterozomii XX. Există și situația în care femelele sunt heterogametice (XY sa ZW), pe când masculii sunt homogametici (XX sau ZZ). În mod obișnuit, schimbul recombinațional între X și Y este foarte limitat sau este exclus cu desăvârșire. La unele specii, recombinarea este supresată pe o parte a cromozomilor sexelor, ca urmare a inversiunilor cromozomale care fac ca X să fie diferit de Y, în orânduirea genelor. La alte specii schimbul este limitat la o mică regiune a perechii XY, așa cum se întâmplă la mamifere. La anumite grupe, precum ***Drosophila* dintre Diptere și la Lepidoptere, crossing-over-ul este absent la toți cromozomii, la sexul heterogametic (masculii la *Drosophila*, femelele la Lepidoptere).**

Absența schimbului de material genetic se asociază cu absența omologiei genetice dintre regiunile relevante ale cromozomilor X și Y. La mamifere, regiunea de împerechere aflată la unul dintre capetele cromozomului Y conține loci omologi cu locii aflați la unul dintre capetele cromozomului X. Restul cromozomului Y este în cea mai mare parte lipsit de loci genici funcționali, cu excepția unui număr mic de loci genici implicați în determinarea sexului mascul și fertilității spermatozoizilor.

La **Drosophila melanogaster**, cromozomul Y este în cea mai mare parte lipsit de loci genici funcționali, cu excepția unui cluster de gene pentru ARN ribozomal, șase loci genici implicați în fertilitatea masculului și locusul genic **Stellata**. Cea mai mare parte a cromozomului Y pare a conține secvențe de ADN înalt repetitive, similare ca natură cu elementele genetice transpozabile și cu secvențele satelitice de tipul celor asociate cu heterocromatina centrică. Într-adevăr, de obicei cromozomul Y este descris ca un cromozom prin excelență heterocromatic. **Dimensiunea cromozomului Y este variabilă la diferite specii, ceea ce sugerează că secvențele sale ADN nu au semnificație funcțională.**

Compensația de doză este un corolar al absenței locilor funcționali pe cromozomul Y și, în consecință, a statului hemizigoției cromozomului X, de la sexul heterogametic. Acest fenomen atrage după sine retușarea activității locilor genici X-lincați, astfel încât să se asigure ca RATA DE TRANSCRIERE A ACESTOR LOCI X-LINCAȚI LA MASCULI SĂ FIE DUBLĂ FAȚĂ DE ACEEA DE LA FEMELE. La mamiferele euteriene, acest lucru este realizat PRIN INACTIVAREA TRANSCRIPȚIONALĂ INTEGRALĂ A UNUIA DINTRE CEI DOI CROMZOMI X, de la FEMELĂ.

Într-adevăr, la **Drosophila** și **Caenorhabditis elegans**, această compensație a dozei de gene X-lincate este asigurată printr-o rată mai mare de transcripție a locilor din cromozomul X, de la masculi.

Există numeroase exemple de evenimente intermediare de diferențiere în structura și diferențierea genetică dintre cromozomii X și Y. În consecință, pare probabil ca sistemele evoluate, avansate, să-și aibe originea în sistemele biologice în care cromozomii X și Y au fost inițial în mare măsură omologi, din punct de vedere genetic. Evoluția paralelă a sistemelor evoluate de sex în diferite grupe de viețuitoare sugerează în mod elocvent că în procesul diferențierii determinismului genetic al sexelor au fost implicate forțe evolutive relativ simple. Identificarea acestor forțe a constituit un obiectiv de atracție pentru mulți geneticieni. **Explicația clasică a inerției (inactivității) genetice a cromozomului Y** a fost dată de Mulller, care a admis că X și Y au fost inițial omologi, dar erau lipsite de schimb de gene pe o parte sau pe toată lungimea lor. El a sugerat că pe o regiune cromozomală, permanent menținută heterozigotă, fără schimb cu omologul ei, va acumula mutații recesive, dăunătoare, deoarece creșterea lor sub acțiunea presiunii mutaționale nu va fi oprită de selecție. Fisher, la rândul său, a afirmat că un asemenea mecanism nu este funcțional deoarece protocromozomul X conținea aceiași loci genici pe care îi conținea protocromozomul Y, astfel că mutațiile recesive Y-lincate vor întâlni mutațiile alelice purtate de Y și vor fi în consecință eliminate, sub acțiunea selecției.

În plus, această teorie nu explică compensația de doză, deoarece nu este nevoie să fie compensată pierderea activității genice a cromozomului Y, dacă efectele mutațiilor au fost complet recesive. Teoreticienii clasici nu au prezentat nici o specificitate de detaliu privind procesele prin care populația ca întreg a ajuns să dobândească proprietățile în discuție. Date recente, teoretice și empirice, privitoare la genetica și evoluția sexualității, oferă o înțelegere mai bună asupra căilor posibile din care au evoluat trăsăturile sistemelor avansate de determinism genetic al sexelor.

2. EVOLUȚIA SEXELOR SEPARATE (UNISEXUALITĂȚII) ȘI CROMOZOMII PRIMITIVI AI SEXELOR

Deși strămoșii îndepărtați ai multor taxoni actuali, cu sexe separate, au putut fi cosexuați, istoria evolutivă a determinării sexelor nu poate fi urmărită. În cazul plantelor cu flori, totuși, originea recentă a dioiciei dintr-o condiție cosexuală este adesea clară. Asemenea cazuri oferă o bază de testare utilă pentru modelele evoluției dioiciei. Cel puțin două etape mutaționale sunt necesare pentru ca din starea de cosexualitate să se ajungă la dioicie: o mutație care determină sterilitatea masculă (androsterilitatea) prin care cosexuali au fost convertiți în femele, și o mutație care a provocat sterilitatea femelă (ginosterilitatea) și prin care cosexuali au fost converiți în masculi. Putem admite că așa se explică de ce și la specia umană actuală, inițial embrionul apare cu potențialități cosexuale sau mai exact este ambigen adică neprecizat ca sex. În cursul dezvoltării embrionare, are loc procesul de diferențiere sexuală: embrionul determinat la fecundație XX va lua calea diferențierii ca femelă; progonada (gonada nediferențiată, cu potențialități ambigene) ve suferi involuția canalelor Wolf și proliferarea canalelor Muller. Are loc totodată involuția părții centrale (medula) și proliferarea părții externe (corticala) care devin ovare – organe gemene, dedublate. Embrionul determinat la fecundație XY va suferi procese de diferențiere exact opuse: partea corticală a progonadei se resoarbe, pe când cea medulară proliferează, diferențiindu-se în testicule; canalele Muller suferă involuție, pe când canalele Wolf proliferează, devenind căi genitale mascule. Ambivalența sexuală inițială este probată și de rudimente de organe genitale externe de tip mascul, la femelă (clitoris).

La bărbat, în mod normal nu se cunosc rudimente de organe genitale de tip femel. Fundamental, indivizii umani sunt femei!

Prima etapă în evoluția dioiciei a implicat probabil invazia populației cosexuale de către femele, rezultând un polimorfism pentru femele și cosexuali (ginodioicie). A doua fază implică conversia cosexualității în masculi, fie printr-o singură mutație de sterilitate femelă sau printr-o serie mai gradată de reduceri progresive în fertilitatea femelelor (Charles Worth, 1987).

Doi factori cauzali majori au condus acest proces: realocarea resurselor și evitarea incestului. Primul implică ideea că o mutație care reduce fertilitatea masculă sau femelă poate cauza o creștere în fertilitatea funcției sexului opus, ca rezultat al realocării resurselor destinate reproducerii. Cel de al doilea factor implică faptul că un individ cu o singură funcție sexuală nu se poate autofecunda, astfel că progenitura sa va evita pierderea fitness-ului asociat adesea cu consangvinizarea apropiată. Dacă acest efect este important în evoluția dioiciei, populația cosexuală inițială este supusă unui eveniment semnificativ de autofecundație: această afirmație este susținută de dovezi comparative care indică faptul că rudele apropiate ale speciilor de plante dioice sunt de obicei autofertile.

Prima treaptă spre dioicie a fost mai probabilă în a implica o mutație de sterilitate masculă decât o mutație generatoare de sterilitate femelă, deoarece accesul gameților masculi la gameți femeli ai altor plante este restrict de autofecundație. Aceasta reduce valoarea genetică a masculinității raportată la fecunditate într-o populație autofertilă cosexuală. În plus, o mutație care reduce fertilitatea masculă este mult mai probabilă să fie favorizată dacă ea are un efect mare, deoarece efectele mici vor reduce rareori semnificativ rata autofecundării. Din momentul în care sunt prezente femelele în populație, va exista un avantaj mai mare al masculinității, decât în starea inițială și mutațiile care provoacă reducerea ferilității femele și concomitent vor crește fertilitatea masculă se pot răspândi. Nu există nici o prioritate selectivă specială asupra mutațiilor cu efect mare în această etapă, astfel că, în acest proces pot fi implicați loci mutipli, cu efecte mici asupra fertilității femele. Indivizii care combină atât genele de sterilitate masculă cât și pe cele pentru sterilitate femelă au o pierdere netă în fitness, astfel că faza secundă este mult mai probabil să apară dacă apar mutațiile de sterilitate femelă la loci care sunt strâns lincați cu locusuri de sterilitate masculă. În plus, există selecție pentru rearanjamentele de gene sau de cromozomi care restricteză crossing-over-ul dintre loci care controlează fenotipul sexual mascul și femel și pentru modificatori de dominanță care creează relații de dominanță complementară dintre cele două tipuri de gene ale sterilității. Astfel, fenotipuri sexuale intermediare vor fi prezente în populație (subdioice). Dată fiind pierderea probabil completă a fertilității mascule în etapa inițială, populațiile subdioice ar trebui să prezinte integrarea dintre masculi și cosexuali, cu femelele formând o clasă distinctă, cum de altfel se observă în realitate.

Cu dioicie deplină, trebuie să se fi stabilit un sistem primitiv de cromozomi ai sexelor. Proto-X-ul a purtat gene ce conferea fertilitate femelă și sterilitate masculă. Analizele genetice ale cazurilor de determinare genetică a sexelor fără diferențe structurale evidente dintre X și Y indică faptul că acest sistem este comun la speciile la care dioicia este de dată recentă. Dacă mutațiile inițiale de sterilitate masculă sunt cel mai adesea recesive, heterogameția masculă va fi mai comună decât heterogameția femelă. Deoarece recesivitatea este caracteristică pierderii mutațiilor funcționale și, deoarece alelele recesive avantajoase pot fi ușor stabilite în populațiile parțial autogame, se explică prin acești doi factori frecvențele relative ale acestor două tipuri de determinare a sexelor.

Pe baza acestui model simplu se sugerează că prima etapă în evoluția cromozomilor de sex implică restrângerea recombinării dintre gene ce controlează funcțiile sexuale mascule și femele, mai curând decât dintre cromozomii X și Y, fie în întregime, fie în cea mai mare parte a lor. Sistemele primitive de cromozomi ai sexelor adeseori prezintă acest pattern. De ce adesea a trebuit mai multă restricție a schimbului genetic? Orice variantă genetică care este avantajoasă la sexul heterogametic, dar puternic dezavantajoasă la sexul homogametic va fi răspândită în populație, dacă este lincată cu regiunea determinatoare a sexului a cromozomului Y. Exemplele sunt oferite de pattern-urile de culoare strălucitoare de la masculii speciilor de pești din genurile **Poecilia** și **Xiphophorus**. În ciuda vulnerabilității lor mai mari față de prădători, aceste modele sunt avantajoase masculilor, în cadrul selecției sexuale. Restricția recombinării dintre regiunea determinatoare a sexului și locii care controlează asemenea caractere sexuale secundare va fi favorizată de selecție. Elaborarea diferențelor fiziologice, morfologice și comportamentale dintre sexe conduce la selecția pentru alte diferențe alelice dintre proto-X și proto-Y și la un schimb genetic redus pe o regiune largă.

3. EVOLUȚIA UNUI CROMOZOM Y DEGENERAT ȘI COMPENSAȚIA DE DOZĂ

Mulller a emis ipoteza degenerării cromzomului Y (H.J. Muller, Genetics 2, 422 – 1918) dar nu a fost împărtășită de alți geneticieni, propunându-se alternative. Una dintre acestea invocă procesul stohastic cunoscut sub numele de *piedica de roată a lui Muller*.

Considerând o regiune cromozomală ce conține un număr mare de loci susceptibili la mutații dăunătoare, alelele mutante la fiecare locus sunt menținute la o frecvență redusă de către selecție. Într-o populație infinită este realizat un echilibru al distribuției numărului de loci mutanți per individ. Dacă nu există o recombinare în această regiune și dacă mutațiile de revesie sunt rare, clasa lipsită de mutații poate fi pierdută din populație și nu mai poate fi restabilită. În plus, clasa purtătoare a unei singure mutații devine de asemenea vulnerabilă la pierderea probabilistică ș.a.m.d. Pe măsura trecerii timpului, numărul minim de mutații pe cromozom crește progresiv, fără ca altele dăunătoare să fie fixate la locii considerați. Operarea „piedicii de roată a lui Muller pe cromozomul proto-Y creează selecția în favoarea creșterii activității lui X raportat la Y, la sexul heterogametic (cu excepția genelor care controlează expresia sexului și a locilor din regiunea de împerechere). Reducerea transcripției genice la sexul heterogametic va determina apariția **tipului Drosophila** de compensație a dozei de gene X-lincate concomitent cu inactivarea lui Y.

Dacă creșterea activității lui X nu este limitată la sexul heterogametic, atunci va rezulta un Y inactiv, dar fără compensație de doză, așa cum poate fi cazul la păsări și Lepidoptere.

Tipul de compensație de doză caracteristic mamiferelor a putut apare ca răspuns la acest tip de situație, deoarece acesta crează un avantaj selectiv la reducerea activității lui X la sexul homogametic, de aici restabilind echilibrul dintre produșii genici autosomali și cei X-determinați. Finalul acestui proces ar fi inactivarea totală a lui X, la sexul homogametic, așa cum se constată în prezent la mamiferele euteriene. Inactivarea lui X patern întâlnită la marsupiale poate reprezenta un stadiu intermediar în cadrul acestui proces.

Al doilea proces, depinde de faptul că, în absența recombinării, răspândirea unei alele mutante favorabile, Y-lincate, într-o populație, determină fixarea alelelor dăunătoare la alți loci care se întâmplă să fie prezenți în cromozomul Y, în care și-a făcut apariția mutația. În consecință, va fi selecție pentru activitatea crescută a locilor omologi de pe cromozomul X al sexului heterogametic, conducând la reducerea gradată a activității lui Y și activitatea crescută a lui X, pe măsură ce mutațiile succesive Y-lincate au devenit fixate.

4. ACUMULAREA DE SECVENȚE REPETATE DE ADN ÎN CROMOZOMUL Y

Elementele transpozabile care se autoreplică și se inseră în situsuri noi, sunt predispuse a se acumula în cromozomul Y pentru mai multe motive. De îndată ce activitatea genetică a lui Y a fost redusă, vor fi consecințe mai puțin dăunătoare fitness-ului ale inserției în Y și de aici creșterea transpozițională în abundența de elemente nu va fi opusă selecției. În plus, recombinarea dintre secvențe similare la diferite situsuri generează rearanjamente cromozomale dăunătoare și elimină elementele implicate. În absența schimbului, aceasta nu se poate întâmpla, astfel că elementele vor avea tendința de a se acumula. În sfârșit, acumularea de elemente poate avea loc potrivit „ipotezei piedicii" a lui Mulller în regiunile unde schimbul este absent. Secvențe simple de ADN repetate în tandem (fără capacități transpoziționale) sunt de presupus a se acumula în regiunile de restricție a schimbului. Schimbul inegal dintre secvențele repetate nu cauzează vreo schimbare în numărul mediu de repetiții dar crește varianța. Într-o populație finită și în absența tuturor celorlalte forțe evolutive, va avea loc eventual fixarea probabilistică a unui cromozom ce poartă o copie a secvenței și populația va rămâne în această stare. Pierderea unei familii de repetiții este astfel promovată de un schimb inegal.

Dacă selecția împotriva indivizilor care poartă numere mari de repetiții este slabă, dar repetițiile sunt generate ocazional de un proces de amplificare, atunci numărul mediu de repetiții se echilibrează la un nivel mult mai înalt dacă schimbul este infrecvent. Acumularea atât a secvențelor simple, cât și a elementelor transpozabile în cromozomul Y, reprezintă o parte a unui pattern mai lung și de aici aceste secvențe se acumulează în regiunile în care schimbul genetic este restrict. Există dovezi empirice pentru un asemenea pattern. Dioicia a putut deriva la plante și pornind de la distilie (heterostilie). La animale se cunosc tranziții dintre diferitele moduri de determinare genetică a sexelor. Determinismul genetic al sexelor la vertebrate poate uneori să fi evoluat din determinismul de mediu al sexelor, mai curând decât din cosexualitate, dar nu este cunoscută în detaliu natura acestei tranziții. În mod similar, determinismul sexelor la **Drosophila** și **Caenorhabditis elegans** implică un echilibru dintre genele determinate ale feminității din cromozomul X și factorii determinatori ai masculinității, localizați în autozomi. Modelul descris mai sus este cel al localizării genelor pentru masculinitate în cromozomul Y.

Studiul sistemelor cromozomale primitive de determinsm genetic al sexelor ar putea clarifica dacă degenerarea și compensația de doză au evoluat pe o bază gradualistă, genă-cu-genă, sau ar implica blocuri mari de material cromozomal. Cromozomii de sex secundari au constituit substrat pentru neo-X și neo-Y, apăruți prin fuziuni centrice dintre cromozomii de sex vechi stabilizați și autozomi.

CAPITOLUL XIX

EVOLUȚIA SEXELOR, CROMOZOMII SEXUALI ȘI GENELE SEXUALIZANTE

1. INTRODUCERE

Constituirea gonadelor și diferențierea sexelor sunt procese fundamentale ale dezvoltării unui organism, având în vedere importanța sexelor pentru viața și perpetuarea speciei.

Ceea ce frapează pe un biolog la cercetarea detaliată a evoluției diverșilor taxoni din regnul animal, în privința sexualității acestora, este remarcabila varietate de mecanisme ale producerii sexelor.

În cursul evoluției, natura a încercat diverse mijloace de ieșire de pe drumul blocat de uniformitatea impusă de diviziunea simplă a celulelor procariote. Evoluția a căutat o ieșire spre variabilitate, spre reproducere, spre recombinare genetică și a găsit mai multe soluții dintre care unele au rămas viabile până astăzi.

În cele ce urmează sunt prezentate căile utilizate de cele mai multe nevertebrate și vertebrate în vederea obținerii unui control cât mai riguros al producerii celor două sexe. Vom vedea că acest drum, dificil la început datorită acțiunii cu preponderență a factorilor de mediu și unor slabe influențe genetice, a devenit treptat un drum cu direcție precisă, prin perfecționarea mecanismelor genetice care s-au impus ca determinante gonadice, iar factorii negenetici au devenit auxiliari și determinanți ai caracterelor sexuale secundare.

2. HERMAFRODITISMUL – O CALE DE SEXUALIZARE PRIMITIVĂ LA EUCARIOTE

Orice analiză a determinismului sexelor la nevertebrate și vertebrate trebuie să ia în considerare fenomenul de hermafroditism. Prezența ambelor tipuri de gonade: femele și mascule în același individ reprezintă un sistem reproductiv normal la nevertebratele inferioare, dar și la o parte din vertebrate cum sunt peștii și amfibienii.

Nematodele, al căror reprezentant tipic este *Caenorhabditis elegans*, prezintă două tipuri de sexe: masculi și hermafrodiți. Hermafrodiții sunt din punct de vedere somatic femele. La început, aceștia produc spermatozoizi (circa 200) și apoi produc ovocite. Aproape 30% din celulele unui hermafrodit adult și aproape 40% din celulele unui mascul adult sunt specializate sexual și toate țesuturile apar cu dimorfism sexual.

Crustaceele cele mai primitive, izopodele, sunt hermafrodite, deși există și specii cu sexe separate la care, însă, gonadele mascule și femele rămân nediferențiate, mult timp după încheierea vieții embrionare.

Hermafroditismul este calea normală de dezvoltare sexuală la multe specii de pești, putându-se distinge două forme: **hermafroditismul sincron** și **hermafroditismul succesiv.**

Hermafroditismul sincron sau simultan, concretizat prin prezența celor două sexe la același individ, se întâlnește, de exemplu, la specia *Serranidae sciba*. Acești pești sunt bisexuați și trăiesc în cupluri monogame, având capacitatea de a se autofecunda, dar și de a fecunda partenera din cuplu. Acest ultim aspect arată începutul evoluției spre sexe separate.

Deși mult mai puțin răspândit decât la pești, hermafroditismul poate fi întâlnit și la *amfibieni*, în special la anure, la familia Bufonidae, dar și la familia Ranidae.

La unele specii din familia Ranidae, cum este *Rana temporaria*, hermafroditismul este o stare sexuală naturală. Hermafrodiții sunt funcționali și se pot reproduce prin autofecundare sau activând ca masculi.

La familia Bufonidae, hermafroditismul nu este funcțional. Atât masculii cât și femelele posedă organul lui Bidder, un ovar rudimentar situat în partea anterioară a gonadelor

Din punct de vedere evolutiv, organul lui Bidder de la bufonide este o dovadă a unei stări ancestrale de hermafroditism la această familie, dacă nu chiar la toți amfibienii.

La păsări, atât la embrionii de sex femel, cât și la embrionii de sex mascul, gonada stângă conține un epiteliu germinativ capabil de a se dezvolta într-un cortex ovarian, în timp ce gonada dreaptă este lipsită de cortex sau cel mult conține insule corticale mici. Astfel, gonada stângă are proprietăți hermafrodite, în timp ce gonada dreaptă se poate dezvolta numai într-un testicul.

La amfibieni, reptile, păsări și mamifere, embrionii trec printr-un stadiu de dezvoltare ambisexuată. În acest stadiu, gonadele sunt nediferențiate, indiferente, având un potențial de dezvoltare spre gonadele ambelor sexe. Din punct de vedere histologic, nimic din structura gonadei primordiale nu lasă să se întrevadă spre ce tip de gonadă se va produce diferențierea. De asemenea, în această etapă, există în același embrion două sisteme de conducte reproductive: Wolff și Muller, iar sinusul uro-genital este o structură bipotențială, putând să se diferențeize în organe genitale externe femele sau mascule.

În ordine secvențială, în timpul dezvoltării embrio-fetale, gonadele indiferente devin testicule sau ovare, cele două seturi de conducte se reduc la un singur set: Wolff și Muller, iar organele genitale externe se dezvoltă din sinusul uro-genital spre sexul care a diferențiat gonadele.

Datele embriologice asupra diferențierii sexelor permit să se afirme că *la mamifere, inclusiv la om, la începutul dezvoltării sale, embrionul este asexuat, apoi devine hermafrodit și, în final, fetusul dobândește toate caracteristicile sexului mascul sau femel.*

3. INVERSAREA SPONTANĂ A SEXELOR

La o parte din peștii hermafrodiți, s-a remarcat fenomenul de hermafroditism succesiv care se caracterizează prin aceea că indivizii de un sex au capacitatea de a se transforma în indivizi ai sexului opus, adică sunt dotați cu potențialități transsexuale.

Se estimează că 10% din speciile de pești sunt transsexuale.

Unele specii de pești își încep viața ca masculi și o încheie ca femele. Ele fac parte din categoria *hermafrodiților protandri*. Așa sunt dorada gri (*Spondyliosoma chantarus)* și dorada regală (*Sparus aurata)*. Se cunosc 27 de specii de pești-anemone care sunt transsexuali protandri. La acești hermafrodiți, porțiunea testiculară a gonadei se dezvoltă prima, iar partea ovariană e dezvoltată mai târziu. Transformarea masculilor în femele este ireversibilă.

Alte specii de pești sunt *transsexuali protoginici*. La acest tip de hermafroditism, femelele devin masculi pentru că partea ovariană a gonadelor se dezvoltă prima, iar diferențierea părții testiculare are loc mai târziu. În acest tip de transsexualism sunt necesare aproximativ două săptămâni pentru realizarea inversării sexului.

În ceea ce privește factorii care sunt implicați în inversarea sexelor, la peștii hermafrodiți intervin mai mulți factori de mediu printre care un rol important îl are temperatura. Pot, de asemenea, să acționeze și alți factori, precum cei generați în viața de grup.

Astfel, moartea sau îndepărtarea unui mascul dintr-un grup protoginic sau a unei femele dintr-un grup protandru induce inversarea sexului la cel mai mare individ de sex opus. Pe de altă parte, la anumite grupuri monosexuate, un număr minim de femele este necesar pentru ca să aibă loc inversarea sexului și deci absența unui mascul nu este singurul factor care reglează inversarea sexului.

La alte specii protogine, cum este *Labroides dimidiatus*, inversarea sexului este inhibată de existența unui mascul agresiv dominant. O astfel de inhibiție este eliminată prin moartea sau îndepărtarea acestui mascul și atunci cea mai agresivă femelă dominantă suferă inversarea sexului.

Declanșarea inversării sexului poate fi determinată și de raportul dintre sexe și/sau de numărul minim de indivizi din fiecare sex. De asemenea, transformarea sexului este inițiată și sub influența unei densități critice.

Ca și la amfibieni, la unele specii de salamandra (*Pleurodeles waltl)* a fost raportată inversarea spontană a sexului, în condiții de captivitate. S-a constatat că unii indivizi aparent de sex mascul s-au convertit în femele și intersexuați.

4. DIFERENȚIEREA SEXELOR SUB INFLUENȚA TEMPERATURII MEDIULUI ȘI A HORMONILOR SEXUALI ENDOGENI

Evoluția treptată a determinismului sexelor spre intervenția majoră a factorilor genetici cuprinde o etapă intermediară reprezentată de mecanismul determinismului sexelor dependent de temperatură, pe scurt TSD (*temperature dependent sex determination*), răspândit la cele mai multe reptile (crocodilieni, broaște țestoase, șopârle).

Fenomenul TSD a fost studiat extensiv la aligatorul american (*Alligator mississippiensis*) la care temperatura de 30°C și temperaturile inferioare acesteia produc numai femele, iar temperatura de 33°C produce numai masculi. În schimb, temperatura de 35°C produce aproximativ 90% femele. La temperaturi intermediare sunt produse ambele sexe. De exemplu, la temperatura de 32 °C sunt produse femele și masculi, în proporții egale. Acest model de producere a sexelor: femele-masculi-femele nu este prezent doar la aligator, ci este comun tuturor speciilor cu TSD.

Cercetările au stabilit că pentru ambele sexe există o perioadă a dezvoltării embrionare care este sensibilă la variațiile de temperatură. În general, la reptilele cu TSD, perioada termosensibilă se întinde de la mijlocul treimii perioadei de dezvoltare embrionare până la jumătatea acesteia, adică cuprinzând 18-30% din perioada de dezvoltare embrionară.

Temperatura de incubare aplicată înaintea perioadei termosensibile nu este determinatoare de sex și, de asemenea, aplicarea acestei temperaturi după încheierea perioadei termosensibile nu poate produce inversarea fenotipului sexual al gonadelor.

Observațiile lui Crews (1996) pe broasca țestoasă *Trachemys scripta* și cele ale lui Dorrizi și col. (1996) pe broasca țestoasă *Emys orbicularis* au evidențiat că hormonii estrogeni și hormonii androgeni aromatizabili sunt factori fiziologici echivalenți cu temperatura de incubare producătoare de femele, servind ca declanșatori pentru diferențierea sexului femel.

Prin urmare, temperatura își îndeplinește rolul său de determinant sexual prin interacțiunea sa cu hormonii steroizi sexuali și deci cu enzimele steroidogene (ex. aromataza) și receptorii hormonilor steroizi.

Ca și la multe reptile și pești, la care s-a dovedit că hormonii estrogeni joacă un rol cheie în diferențierea sexului gonadic, și la păsări, hormonii estrogeni sunt factori critici pentru diferențierea ovarului, gonada dominantă la această clasă de vertebrate.

După cum se știe, hormonii estrogeni își exercită efectele lor biologice prin intermediul receptorilor proteinici nucleari specifici, care funcționează ca factori de transcripție. La păsări, ambele sexe posedă receptori estrogeni înainte și în timpul diferențierii sexelor, dar transcriptele acestora au fost depistate mai devreme la femele (ziua 3,5 de incubație) față de masculi (ziua 4,5 de incubație). Cu toate că ambele sexe exprimă receptori proteinici estrogenofili, localizarea precisă a transcriptelor receptorilor în interiorul gonadelor diferă la cele două sexe, ceea ce ar putea juca un rol în procesul de determinism al sexelor.

Aceste observații dovedesc că gonadele ambelor sexe își dezvoltă de timpuriu capacitatea de a răspunde estrogenilor în embriogeneză, înaintea diferențierii morfologice, în timp ce capacitatea de a sintetiza estrogeni, specifică sexului femel, se instalează mai târziu (zilele 5-6 de incubație), odată cu exprimarea aromatazei.

Astfel, la păsări, hormonii steroizi sexuali endogeni, produși de gonadele embrionare proprii, au un rol major în diferențierea sexului gonadic, mecanismul sex-determinant al păsărilor fiind mai apropiat de cel al peștilor, amfibienilor și reptilelor care le preced în scara evoluției.

5. GONOCORISMUL

Evoluția sexelor a avut ca etapă finală apariția gonocorismului, adică a indivizilor de sex mascul și de sex femel, deosebiți morfologic, cu tipuri de gonade caracteristice.

Până când avantajele sexelor separate s-au dovedit favorizante, în procesul selecției naturale, și a consacrat definitiv gonocorismul ca o formă superioară de sexualizare, la numeroase nevertebrate și la vertebratele inferioare au coexistat și coexistă forme hermafrodite, cu forme cu inversare spontană a sexelor și cu forme unisexuate stabile.

Pe măsura avansării pe scara filogenetică, preponderența formelor hermafrodite și a celor apărute prin inversarea sexului s-a modificat în favoarea formelor unisexuate, astfel încât, la păsări și mamifere, normalitatea constă în prezența dimorfismului sexual, iar hermafroditismul și inversarea sexului au intrat în sfera patologicului.

În această privință, peștii constituie un exemplu edificator. Având 20.000 de specii grupate în 44 ordine și 550 familii, această clasă de vertebrate etalează o varietate largă de strategii reproductive, cu diferite tipuri de sexualitate, de la hermafroditism la gonocorism.

În schimb, la mamifere există un singur mecanism sexualizant care asigură dezvoltarea celor două sexe: sexul mascul și sexul femel, la indivizi morfologic distincți.

La mamifere, procesul de diferențiere a aparatului genital la sexul mascul și sexul femel se desfășoară în mai multe etape, respectându-se o secvență cronologică care reflectă, de fapt, ierarhia componentelor acestui aparat.

Aceste etape sau evenimente principale se produc în timpul dezvoltării embrionare și fetale, în următoarea ordine:

1. edificarea gonadei primordiale; 2. diferențierea gonadelor; 3. diferențierea tractului genital intern; 4. diferențierea organelor genitale externe.

Orice embrion, până la diferențierea gonadelor spre un sex sau altul, se dezvoltă similar la ambele sexe.

În stadiul indiferent, embrionul posedă două gonade nediferențiate numite gonade indiferente sau progonade, două conducte Wolff, două conducte Muller, un sinus uro-genital și două eminențe genitale. Gonadele indiferente sunt totipotențiale, având capacitatea de a se diferenția, la un moment dat, în testicul sau ovar, în funcție de sexul genetic al individului respectiv. Este o dovadă embriologică că originea sexelor separate se găsește într-un hermafroditism primar.

Conform concepției actuale, procesul de diferențiere a testiculelor din progonade este un proces activ, în timp ce diferențierea în ovare este un proces spontan, pasiv. Dacă în circumstanțe normale nu intervine acțiunea factorului care determină diferențierea progonadei în testicul, gonada indiferentă va deveni, mai târziu, un ovar (Fig.1).

Sexul gonadic al mamiferelor este foarte stabil și nu poate fi modificat sau controlat de hormonii steroizi sexuali.

Cronologic, tractul genital intern (organele genitale interne, fără gonade) se diferențiază mai târziu decât gonadele. Mai mult, tractul genital intern mascul și tractul genital intern femel se diferențiază din structuri anatomice deosebite: canalele Wolff și, respectiv, canalele Muller.

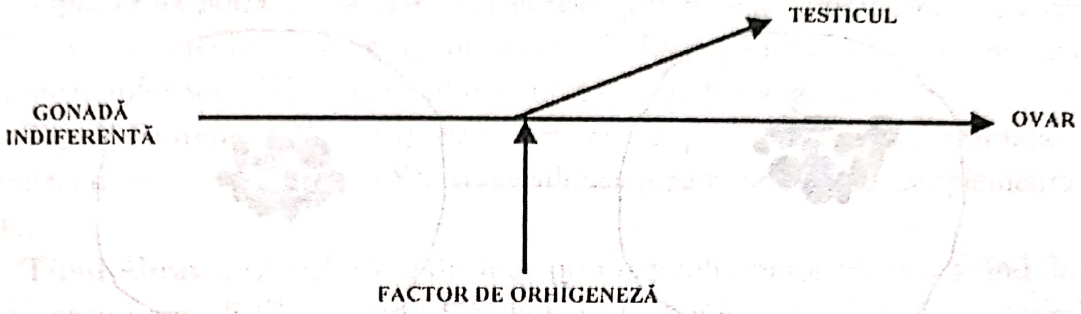


Fig. 1 — Prezentarea schematică a dezvoltării spontane a gonadei indiferente în ovar dacă nu intervine în momentul critic factorul de organizare testiculară (orhigeneză).

Astfel, spre deosebire de gonade care se diferențiază din progonade neutre sexual, dar bipotențiale, procesul de sexualizare a tractului genital intern constă din persistența și dezvoltarea unuia din cele două sisteme de conducte, în timp ce celălalt sistem regresează, nesubzistând decât rudimente fără valoare funcțională.

Pe de altă parte, ca și gonadele, organele genitale externe mascule și femele se diferențiază dintr-o singură structură anatomică fetală bipotențială: sinusul uro-genital.

6. CROMOZOMII SEXUALI

Prima corelație dintre sexul unui individ și prezența unor cromozomi specializați a fost efectuată de H. von Henking, în anul 1891. El a studiat spermatogeneza la insecta *Pyrrhocoris apterus*, pe secțiuni histologice, și a observat un element nuclear intens colorat, prezent numai la 50% din numărul total de spermatozoizi ai insectei (Fig.2).

Nefiind sigur de natura sa cromozomală, uneori considerându-l nucleol sau element cromatinic nedivizat, Henking a notat acest corpuscul cu „X", literă folosită în matematică pentru a desemna o necunoscută.

În anul 1905, E.B. Wilson a efectuat cercetări citologice la insecta *Protenor bleifragei* și a găsit un număr diferit de cromozomi în celulele somatice ale masculilor și ale femelelor. La femele, un cromozom a fost găsit totdeauna în dublu exemplar, în timp ce la masculi, același cromozom nu era decât într-un singur exemplar (la specia *Protenor bleifrageim* femelele sunt XX, iar masculii sunt X0). Făcând legătura cu corpusculul X, al lui Henking, McClung a denumit acest cromozom, cromozomul X.

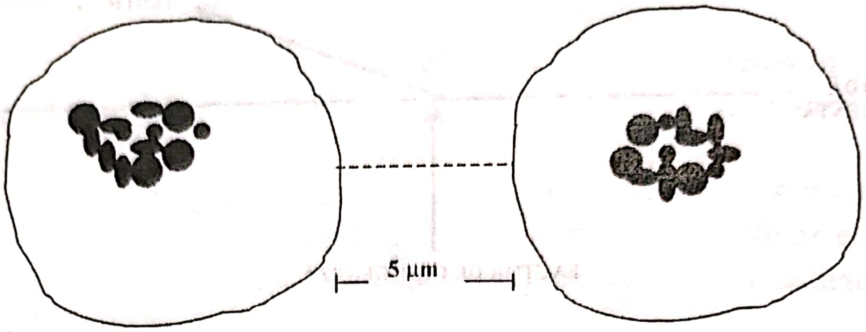


Fig. 2 — Ilustrația lui Henking (1891) pentru cromozomii meiotici ai insectei *Pyrrhocoris apterus*.

Tot în anul 1905, E.B. Wilson studiind masculii insectei *Lygaeus turcicus*, și N.M. Stevens, studiind masculii moliei *Tenebrio molitor*, au remarcat un corpuscul nuclear puternic colorat, mult mai mic decât cromozomul X de la femelele aceleiași specii. După ce au stabilit că acest corpuscul este de fapt un cromozom caracteristic masculilor, ei l-au denumit, în mod firesc, cromozomul Y, având în vedere că la femele cromozomul caracteristic este cromozomul X.

Astfel, denumirile de „X“ și „Y“, date cromozomilor sexuali, nu au legătură cu morfologia lor, ci sunt legate de terminologia folosită în matematică pentru necunoscute.

La mamifere, femela posedă doi cromozomi X, producând un singur tip de ovocite secundare fecundante (cu un cromozom X) din care cauză ea este homogametică. Masculul este sexul heterogametic, deoarece are doi cromozomi sexuali diferiți (X și Y) și produce două categorii de spermatozoizi în proporție de 1:1, o populație purtătoare de cromozom X și o populație purtătoare de cromozom Y.

Ca urmare, sexul genetic este determinat de momentul fecundării, sexul zigotului (XX sau XY) fiind impus de tipul spermatozoidului, deoarece ovocitul este purtător de cromozom X.

7. TIPURI DE DETERMINISM CROMOZOMAL AL SEXELOR

Există patru tipuri fundamentale de determinism cromozomal al sexelor: 1) tipul *Drosophila*, numit încă tipul *Lygaeus* sau *Homo*; 2) tipul *Protenor*; 3) tipul *Abraxas* sau Pasăre; 4) tipul Fluture.

Tipul ***Drosophila*** (XX/XY) se caracterizează prin prezența cromozomilor sexuali XX, la sexul femel, care este, în acest fel, homogametic și prin prezența cromozomilor sexuali XY, la sexul mascul, care este heterogametic.

Tipul Protenor (XX/XO) este caracterizat prin femele homogametice, posedând cromozomii sexuali XX, și maculi heterogametici, având complementul XO.

Tipul Abraxas (ZZ/ZW) se distinge prin masculi homogametici, având doi cromozomi sexuali (ZZ) și prin femele heterogametice, având doi cromozomi sexuali diferiți: Z și W. Prin urmare, în cadrul acestui tip, cu literele Z și W se notează cromozomul heteromorfic caracteristic sexului mascul, ei fiind sinonimi cu cromozomii X respectiv Y, de la tipul *Drosophila*. Tipul *Abraxas* este inversul tipului *Drosophila* și mai este denumit tipul *Pasăre,* deoarece acest tip caracterizează sexele la toate speciile de păsări.

Tipul Fluture (ZZ/ZO) constă din masculi homogametici, având cromozomii sexuali ZZ și din femele heterogametice, având un singur cromozom sexual Z, ele fiind ZO. Tipul *Fluture* este inversul tipului *Protonor*.

În general, hermafroditismul este caracteristic speciilor care nu posedă cromozomi sexuali diferențiați și specializați.

La nevertebratele inferioare, cum sunt nematodele, al căror reprezentant tipic este *Caenorhabditis elegans*, chiar dacă indivizii hermafrodiți posedă cromozomii sexuali XX care definesc sexul femel, determinismul sexelor se bazează, se fapt, pe raportul dintre numărul cromozomilor X și seturile de autozomi (A), adică X/A.

În anul 1979, Madl și Herman au stabilit prin analiza poliploizilor că indivizii cu raportul X/A=0,75 sau mai mare (3X: 4A, 3X: 3A, 4X:4A) se dezvoltă ca hermafrodiți, iar indivizii cu un raport X/A de 0,67 sau mai mic (2X: 3A, 2X: 4A, 1X:2A) se dezvoltă ca masculi.

De asemenea, crustaceele cele mai primitive sunt hermafrodite, dar există și specii cu sexe separate, așa cum sunt izopodele, care posedă cromozomi sexuali ZZ/ZW. La aceste izopode s-a constatat fenomenul de inversare spontană a sexelor prin captarea de bacterii din genul *Wolbachia*. Femelele sunt în realitate masculi ZZ care conțin în citoplasmă bacteria *Wolbachia* sau au integrat în nucleu o parte a genomului bacterian care conține informația femelizantă.

Se cunosc 20 specii de izopode infectate cu *Wolbachia*. Procesul de infectare cu *Wolbachia* care are drept urmare inversarea sexului mascul în sex femel, evocă, de fapt, procesul ancestral de producere a cromozomului W, caracteristic femelelor.

Într-o etapă foarte îndepărtată, prin acțiunea selecției naturale, crustaceii hermafrodiți cu mai puțini masculi decât femele au fost privilegiați și, în cele din urmă, s-au transformat în masculi adevărați. Pe de altă parte, inserția repetată a secvenței femelizante din genomul bacteriei *Wolbachia* într-un cromozom Z, s-a încheiat prin generarea unui cromozom W.

Cu totul alta este situația peștilor hermafrodiți. La aceste specii, cromozomii sexuali nu au putut fi demonstrați citologic. În privința determinismului genetic al peștilor hermafrodiți, cunoștințele sunt reduse și limitate.

Hermafroditismul este prezent și la amfibieni, dar numai la anure. Spre deosebire, însă, de peștii hermafrodiți, anurele hermafrodite posedă cromozomi sexuali și anume XX ca și în cazul nematodelor hermafrodite.

8. SEPARAREA SEXELOR ÎN RELAȚIE CU PREZENȚA SAU ABSENȚA CROMOZOMILOR SEXUALI SPECIALIZAȚI

Apariția indivizilor unisexuați nu a fost rezultatul acțiunii unui singur mecanism de determinism al sexelor. Natura a încercat diverse căi pentru a ajunge la același rezultat și acest lucru este evidențiat în mod pregnat de lumea insectelor.

La insectele unisexuate s-au dezvoltat mai multe mecanisme pentru controlul determinismului sexelor. Așa sunt: sistemele fără cromozmi sexuali heteromorfici, sistemele monofactoriale autozomale, sistemul haploid-diploid, sistemele fundamentate pe raportul dintre numărul de cromozomi X și numărul seturilor de autozomi (X/A), sistemele bazate pe produși de origine maternă, sistemele XX/XY.

La himenoptere nu există cromozomi sexuali. Cel mai frecvent mecanism de reproducere la insectele din ordinul *Hymenoptera* este arenotoxia. Masculii sunt indivizi care se dezvoltă din ovocite nefecundate, iar femelele sunt diploide și se dezvoltă din ovocite fecundate. De exemplu, la albine, femelele au 32 de cromozomi în celulele lor somatice, iar masculi au 16 cromozomi, atât în celulele somatice, cât și în gameți. Meioza I reducțională are loc numai în ovogeneză, pe când în spermatogeneză lipsește un asemenea mecanism de reducere a numărului de cromozomi, acestea desfășurându-se ca o mitoză.

Determinismul sexelor la himenoptere este, prin urmare, diplogenotipic pentru femele care moștenesc caracterele ambilor părinți și haplogenotipic pentru masculi care moștenesc numai caracterele mamei.

La *Musca domestica*, nu acționează un singur mecanism de determinism sexual, ci câteva mecanisme sex-determinante asemănătoare. În felul acesta, *Musca domestica* oferă unica ocazie de a studia diferite mecanisme de determinism sexual la o singură specie și de a le compara cu mecanismele remarcate la alte specii înrudite în scopul analizei căilor evoluției și a soluțiilor găsite.

La *M. domestica* există patru sisteme sex-determinante în cadrul cărora acționează factorul F care specifică sexul femel și factorul M care determină sexul mascul.

Tulpinile standard de *M.domesica* au un complement de 12 cromozomi: 5 perechi de autozomi și o pereche de cromozomi sexuali: XX sau XY. Cromozomul Y este purtător al factorului dominant M. Două copii ale factorului M sunt necesare pentru a asigura o dezvoltare normală a sexului mascul.

Există subpopulații naturale la *M.domestica* la care ambele sexe sunt caracterizate prin prezența a doi cromozomi X. La aceste tulpini, factorul M se poate găsi pe oricare cromozom (X și autozomi) și masculii sunt heterogametici M/+.La alte subpopulații, există și cromozom Y, iar factorul M dominant este situat pe oricare din cromozomi (Y, autozomi, X).

La unele subpopulații de *M.domestica* femelele reprezintă sexul heterogametic, prin prezența pe autozomul IV a factorului dominant (F^{Do}) determinant al sexului femel, epistatic față de M. De aceea, la aceste linii sexul femel se dezvoltă indiferent de prezența sau absența cromozomului Y.

În sfârșit, la unele tulpini de la *M.domestica*, variații cantitative ale unor produse materne acționează ca niște mecanisme de determinism al sexelor, în absența factorului M sau F^{D}.

La baza celor patru mecanisme de determinism sexual, identificate la *M.domestica*, se poate spune că la această specie sistemul sex-determinant este flexibil, deschis pentru modificări și încă în curs de evoluție rapidă.

La *Drosophila melanogaster*, deși indivizii XX sunt femele, iar indivizii XY sunt maculi, gonozomul Y este determinant al testiculelor. Determinismul sexului somatic se bazează pe proporția cromozomilor X față de seturile de autozomi, adică raportul X/A. Raportul X/A reprezintă, de fapt, o balanță între factorii X-lincați sexualizanți și factorii sex-determinanți de pe autozomi. Dacă raportul X/A=1, individul rezultat este de sex femel; dacă raportul X/A=0,5, individul este de sex mascul. În cazul unui raport X/A cuprins între 0,5 și 1 se realizează o dezvoltare intermediară a sexului, adică apare intersexualitatea. Această balanță cromozomală funcționează în sens sex-determinant și la alte nevertebrate (de exemplu, la nematodul *C.elegans*).

La alte insecte funcționează ca sex-determinant sistemul XX/XO. Acest determinism cromozomal al sexelor este prezent la *Protenor bleifragei*, la *Locusta viridissima* (la care femelele au 32 de cromozomi, iar masculii au 31 cromozomi), la *Anasa tristis* (la care femelele au 2n=22 cromozomi, iar masculii au 2n=21 cromozom).

Se consideră că sistemul XO a derivat din sistemul XY primitiv în cursul evoluției, având în vedere că la *Drosophila* există o aparentă dispensabilitate a cromozomului Y.

La numeroase specii de lepidoptere și trichoptere, determinismul sexelor este de tip ZZ/ZW. La unele specii de lepidoptere, cum sunt *Phragmatobia fuliginosa* și *Fumea casta*, determinismul sexelor este de tip ZZ/ZO.

La peștii gonocorici sunt prezente toate tipurile de determinism genetic descrise la vertebrate. Deși unele specii de pești evienţiază cromozomi sexuali citologic diferențiabili, majoritatea peștilor gonocorici nu posedă cromozomi sexuali bine diferențiați morfologic, discuțiile despre cromozomii X, Y și W fiind bazate adeseori pe rezultatele încrucișărilor genetice. Cele mai multe studii genetice s-au efectuat la speciile genului *Xiphophorus* și, în cea mai mare parte, aceste specii se caracterizează prin sistemul XX/XY.

Heterogameția masculilor de tip XY a fost evidențiată la speciile *Oryzias latipes, Carassius auratus, Cyprinus carpio, Ictalurus punctatus*, iar heterogameția masculilor de tip XO la speciile *Sternoptyx diaphana* și *Lampanyctus rittery*.

La speciile *Gambusia affinis* și *Apeltes quadracus*, femelele sunt heterogametice ZW, iar masculii sunt ZZ.

Alte modele de determinism cromozomal al sexelor întâlnite la pești sunt cele care cuprind cromozomi sexuali multipli: ZZ/YW_1W_2; $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$; XX/XY_1Y_2.

În felul acesta, nici un model de determinism genetic al sexelor nu poate fi generalizat la pești.

La amfibieni, cele mai multe specii sunt gonocorice. Cromozomii sexuali au fost identificați la aproape 50 specii de amfibieni. Atât la anure cât și la urodele au fost remarcați masculi heterogametici (XY), dar și femele heterogametice (ZW).

Speciile genurilor *Ambystoma, Pleurodeles* și *Xenopus* se caracterizează printr-un mecanism genetic ZZ/ZW și toate combinațiile posibile ale cromozomilor sexuali: ZZ,ZW și WW sunt viabile.

La *Rana rugosa*, femelele sunt XX, în unele populații, iar în alte populații, femelele au genotipul ZW. La *Rana esculenta*, masculii sunt XY, dar la *Rana tigrina*, femelele sunt ZW.

La multe specii la care cromozomii sexuali nu sunt distincți morfologic, testele de încrucișare a indivizilor cu sex inversat (produși experimental) cu indivizi normali au stabilit prezența heterogameției masculilor sau a femelelor. În felul acesta s-a dedus existența sistemului XX/XY, la *Rana clamitans*, și a fost confirmat același sistem la *Triturus vulgaris*, iar prezența mecanismului ZZ/ZW a fost confirmat la *Pleurodeles waltl.*

Deși determinismul genetic al sexelor la amfibieni este bine stabilit, există puține date referitoare la modul în care operează sistemul cromozomului W cum o demonstrează femelele triploide ZZW, deși grefe de gonade ZZ pot masculiniza o gazdă ZW.

La reptile, se remarcă, de asemenea, o diversitate de mecanisme care intervin în determinismul sexelor. Astfel, la șerpi, șopârle și broaște țestoase, la unele specii, se remarcă prezența cromozomilor sexuali heteromorfici, iar la alte specii, heterocromozomii nu sunt prezenți. La crocodili nu s-au descris încă cromozomii sexuali distincți citologic.

La speciile de reptile la care nu există cromozomi sexuali diferențiați, sexul embrionilor este determinat de temperatura de incubare o ouălor.

Evoluția cromozomilor sexuali, așa cum s-a desfășurat ea în decursul milioanelor de ani, la nivelul diverselor viețuitoare, poate fi observată, cu variatele sale modele, la șerpi, începând cu cromozomii homomorfici la ambele sexe, apoi tipuri heteromorfe moderate și, în cele din urmă, cromozomii sexuali puternic heteromorfici. Ori de câte ori heteromorfismul cromozomilor sexuali este pregnant, heterogameția (ZW) caracterizează femelele, iar homogameția (ZZ) caracterizează masculii. Lipsa cromozomilor sexuali heteromorfici este evidentă la cei mai primitivi șerpi, pe baza caracteristicilor scheletului, adică la șerpii boa și pitoni (familia Boidae) cu excepția lui *Acrantophis durnereli* la care sunt prezenți cromozomii Z și W, deși aceștia sunt egali în dimensiune. În schimb, cei mai evoluați cromozomi heteromorfici se găsesc la șerpii cei mai avansați din punct de vedere evolutiv : șerpii cu clopoței, din familia Viperidae. Șerpii din familia Colubridae (*Elaphe obsoleta, E.subocularia, Thamnophis marcianus*) sunt intermediari, cromozomii lor Z și W fiind similari ca dimensiune, deosebindu-se doar prin poziția centromerului.

La șopârle și broaște țestoase există o minoritate de specii care posedă cromozomi sexuali heteromorfici. S-au descris atât masculi heterogametici (XY), cât și femele heterogametice (ZW).

La păsări, determinismul genetic al sexelor este consolidat față de reptile și nu mai există variabilitatea sistemelor de cromozomi sexuali. Există un singur sistem : ZZ/ZW, masculii fiind homogametici (ZZ), iar femelele heterogametice (ZW).

Totuși, două particularități ale modului de diferențere a sexelor constatate la unii amfibieni și la reptile s-au păstrat și la păsări, deosebindu-se în acest fel de mamifere: 1) hormonii sexuali endogeni au un rol esențial în diferențierea gonadelor; 2) în ovogeneză, în timpul diplotenului, bivalentul Z-W dobândește aspectul de cromozomi în perie de lampă.

Ca și cromozomii Z și W, de la amfibieni și reptile, cromozomii sexuali Z și W, de la păsări, provin dintr-o pereche ancestrală de autozomi homomorfici, din care s-au diferențiat și evoluat timp de 60-100 milioane de ani. La păsări, însă, această evoluție s-a produs separat și nu are nimic în comun cu evoluția cromozomilor Z și Y de la aceleași clase și de la mamifere. Fiecare din perechile de cromozomi sexuali ale claselor de vertebrate enunțate a avut propria lor pereche ancestrală de autozomi din care a evoluat treptat.

La mamifere, sistemul de bază de determinism al sexelor este sistemul cromozomal XX/XY, adică tipul *Drosophila*, în care femela este homogametică și masculul este heterogametic. Spre deosebire de păsări, hormonii sexuali endogeni nu au nici un rol în diferențierea sexului gonadic, ceea ce denotă eliminarea influențelor altor factori interni și externi în afara factorilor genetici deveniți cruciali, esențiali în asigurarea desăvârșirii diferențierii sexuale.

Există la mamifere cazuri sporadice de abatere de la sistemul standard XX/XY. Așa sunt:

– sistemul cromozomilor sexuali Y multipli (XX/XY_1Y_2) la insectivorul *Sorex araneus*, rozătorul *Gerbillus gerbillus*, liliecii americani din genul *Carollia* și *Chaeroniscus*;

– sistemul cu doi cromozomi X diferiți (X și X^*) de la lemingul scandinav *Myopus schisticolor;*

– sistemul XY comun ambelor sexe, la rozătorul *Akodon azarae*;

– sistemul XO comun ambelor sexe la șoarecele cârtiță *Ellobius lutescens*;

– sisteme diferite pentru celulele somatice și celulele germinale (XO/XX și respectiv XY/YO), la șoarecele *Microtus oregoni*.

9. GENELE SEXUALIZANTE

Genele care controlează sexualizarea organismelor eucariote într-o secvență ordonată de tip cascadă sunt departe de a fi cunoscute în totalitate și, ceea ce pare și mai surprinzător, nu este clarificat nici rolul exact al genelor de acest fel, identificate până în prezent.

După ce la majoritatea speciilor de animale nevertebrate s-a stabilit existența sau absența diverselor tipuri de cromozomi sexuali, a urmat etapa cea mai dificilă care constă în căutarea și identificarea genelor determinante ale sexelor.

Eforturi considerabile s-au depus în vederea cunoașterii genelor sexualizante la organismele nevertebrate considerate simple și deci mai ușor de abordat. De aceea, cele mai bine cunoscute gene sexualizante sunt cele de la nematodul *Caenorhabditis elegans* și insecta *Drosophila melanogaster*. Totuși, chiar și după încheierea secvențializării genomului la *C. elegans*, în Decembrie 1998, și a genomului la *D. melanogaster*, în Martie 2000, au rămas de completat numeroase gene-verigi din căile de diferențiere a sexelor, la cele două organisme nevertebrate.

În ultimii 10 ani, genele sexualizante ale mamiferelor și păsărilor au fost supuse unei cercetări intense fără egal, în vederea identificării, clonării, cartografierii și stabilirii rolului lor în determinismul sexelor.

Având în vedere că o parte din genele sexualizante descoperite la mamifere și păsări prezintă omologii de structură cu unele gene determinante ale sexelor de la *C. elegans* și *D. melanogaster*, ceea ce arată conservarea lor în decursul evoluției, în acest subcapitol sunt prezentate, la început, genele determinismului sexelor la *C. elegants* și *D. melanogaster*, după care vor fi prezentate genele sexualizării de la mamifere și păsări.

La nematodul *Caenorhabditis elegants*, cascada de evenimente care caracterizează determinismul sexelor este declanșată de gena comutatoare XO lethal (*xol-1)* a cărei activitate este controlată de raportul X/A. Genele x-lincate *fox-1* și *sex-1* sunt femelizante (fig.3).

La indivizii hermafrodiți (XX), raportul X/A este mai mare (1,0) și elementele — semnal *fox-1* și *sex-1* reprimă activitatea genei *xol-1*. Lipsa de activitate a genei *xol-1* determină intrarea în activitate a genelor sdc 1, 2, 3 care vor iniția dezvoltarea sexului hermafrodit prin intermediul genelor *transformer-2 și 3* (*tra-2, tra-3*). Ultimele gene vor activa gena *tra-1* care, la rândul ei, va reprima activitatea genei *mab-3*. Astfel, prezența proteinei TRA-1 determină diferențierea spre sexul hermafrodit (fig.3).

La indivizii masculi XO, raportul X/A este egal cu 0,5 și genele X-lincate *fox-1* și *sex-1* sunt în doză insuficientă pentru a reprima gena comutatoare *xol-1*. Ca urmare, activitatea genei *xol-1* va represa activitatea genelor sdc-1,2,3 și gena *her-1* din aval va promova dezvoltarea sexului mascul, prin intermediul genelor *fem-1,2,3*, care vor scoate din funcție gena *tra-1*. În absența proteinei TRA-1, gena *mab-3* devine activă și se produce diferențierea spre sexul mascul.

La *Drosophila melanogaster*, raportul X/A declanșează ca și la *C.elegans*, activitatea genelor sexualizante de pe parcursul diverselor etape din calea de determinism și diferențiere a sexelor la această insectă.

Gena comutatoare este gena sex-lethal (sxl) (fig.4).

La femele, la care raportul X/A =1, datorită preponderenței genelor lincate: *sis a, b* și *runt*, sub acțiunea produselor acestor gene și a produsului genei materne daughterless (*da*), gena *sxl* intră în acțiune și produsul rezultat SXL este funcțional.

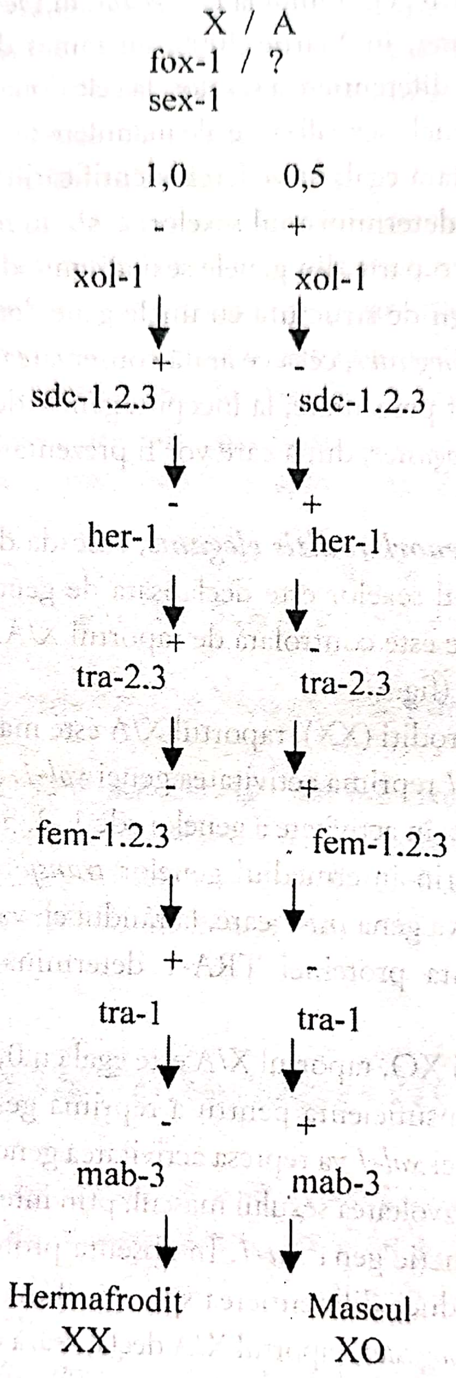

X / A
fox-1 / ?
sex-1
1,0
0,5
-
+
xol-1
xol-1
+
-
sdc-1.2.3
sdc-1.2.3
-
+
her-1
her-1
+
-
tra-2.3
tra-2.3
-
+
fem-1.2.3
fem-1.2.3
+
-
tra-1
tra-1
-
+
mab-3
mab-3
Hermafrodit
XX
Mascul
XO

Fig. 3 — Căile de producere a celor două sexe la *Caenorhabditis elegans*. Semnalul primar pentru ambele căi este raportul X/A care determină intrarea în acțiune a genei xol-1 și diferențierea sexului hermafrodit sau reprimarea genei xol-1, când raportul X/A=0.5, și diferențierea sexului mascul. Gena mab-3 are o poziție terminală în cascadă și de intrarea ei în acțiune depinde dezvolarea hermafrodiților XX. ? = nu se cunosc gene autozomale ale sexualizării.

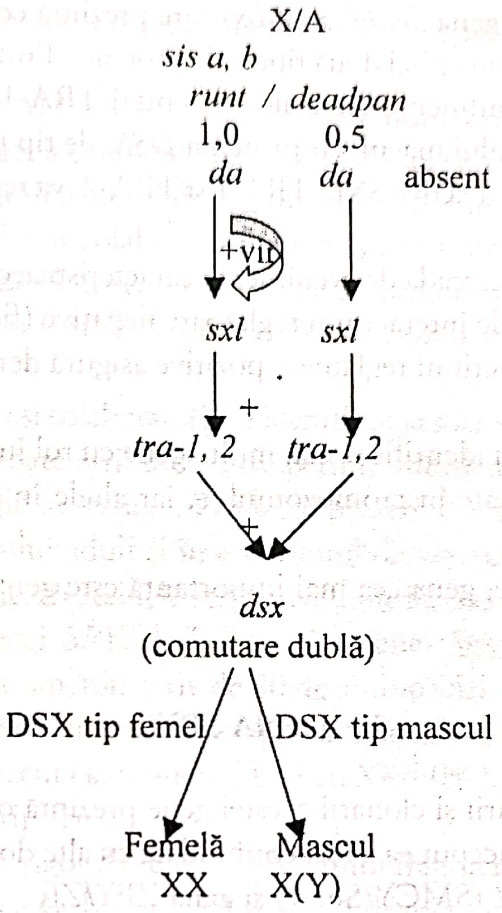


Fig. 4 — Producerea celor două sexe la *Drosophila melanogaster* sub acțiunea inițiatoare a raportului X/A. Împreună cu produsul genei materne *da*, produsele genelor X-lincate *sis a, Sis b, runt,* determină intrarea în activitate a genei *sxl*. Produsul activ SXL va determina prin intermediul genelor *tra-1* și *tra-2* și gena terminală *dsx* dezvoltarea sexului femel.La sexul mascul, gena autozomală *deadpan* determină raportul X/A=0,5 și va provoca producerea de către gena *sxl* a unei proteine SXL inactive. Ca urmare, prin intermediul genelor *tra1, 2,* gena *dsx* va sintetiza o proteină DSX de tip mascul, diferențiindu-se un mascul.

La masculi, raportul X/A =0,5 datorită genei autozomale *deadpan*, ceea ce determină inhibarea genei *sxl* , iar produsul ei (SXL) este nefuncțional. Prin urmare, gena *Sxl* este transcrisă la ambele sexe, dar la sexul mascul, produsul proteinic SXL nu este funcțional.

La sexul femel, intervine și particularitatea menținerii unei activități permanente a genei sxl prin intermediul unei bucle autoreglatoare, realizată de intervenția genei vir. La același sex, proteina SXL acționează ca un factor de episaj asupra ARN mesager produs de genele *tra-1* și *tra-2*, rezultând proteinele active TRA-1 și TRA-2. Sub influența pozitivă a genelor *tra-1* și *tra-2* intră în acțiune gena terminală a cascadei: gena *double sex* (*dsx*) care prezintă comutare dublă, ea fiind capabilă să producă prin episaj două tipuri de proteine. Proteina *DSX*, de tip femel, care se produce sub influența factorilor de episaj TRA-1 și TRA-2, va reprima funcțiile specifice sexului macul, iar proteina *DSX*, de tip mascul, care se produce prin absența proteinelor active SXL. TRA-1 și TRA-2, va reprima funcțiile specifice sexului femel (fig.4).

Dacă la *C.elegans*, cascada de evenimente caracteristice determinismului sexelor implică o succesiune de interacțiuni reglatoare negative (fig.3), la *D.melanogaster*, o succesiune de interacțiuni reglatoare pozitive asigură determinismul celor două sexe (fig.4).

La mamifere, s-au identificat mai multe gene cu rol în determinismul sexelor dintre care unele situate în cromozomul Y, iar altele în autozomi și în cromozomul X.

Dintre aceste gene, gena cea mai importantă este gena *SRY/Sry.*

10. GENA SRY/Sry

Istoricul identificării și clonării acestei gene prezintă o importanță nu numai istorică pentru că la început ea a fost confundată cu alte două gene Y-lincate: gena pentru antigenul H-Y (SMCY/Smcy) și gena ZFY/Zfy.

În ultimii 20 de ani, a existat un consens al cercetătorilor asupra faptului că o genă sau o regiune a cromozomului Y controlează diferențierea testiculelor și, de aceea, în mod convențional, segmentul ipotetic al heterozomului Y care inițiază orhigeneza a fost denumit la om, TDF (*testis determining factor*), adică factorul determinant al testiculului, iar la șoarece, Tdy (*testis determining Y*).

Ca și în alte cazuri de cartografiere genică, speciile abordate au fost, în primul rând, omul și șoarecele de laborator.

La început, s-a stabilit că TDF este localizată în brațul scurt al cromozomului Y uman. Această clasificare parțială a locusului TDF s-a realizat prin studiul sindroamelor reprezentate de bărbații XX și femeile XY, cu disgeneză gonadică pură. Cu ajutorul unor tehnici specifice cartării genice, s-a constatat că la majoritatea bărbaților XX analizați este prezent un fragment cromozomic de mărime variabilă, de la un bărbat XX, la altul și, astfel, s-a conchis că TDF nu poate fi situat decât în segmentul cromozomic care se dovedea a fi comun pentru toți bărbații XX studiați.

Pe de altă parte, în aceeași zonă a cromozomului Y, la femeile XY existau deleții de diverse mărimi. Pe baza delețiilor, din aproape în aproape, s-a demonstrat că segmentul cromozomic comun, conținând TDF, se găsește în brațul scurt al cromozomului Y.

Analizând cu sonde ADN Y specifice un mare număr de bărbați XX, în anul 1989 s-a evidențiat că gena candidată pentru TDf este situată într-un interval de aproximativ 60kb, delimitat distal de regiunea pseudoautozomică PAR-Y 1.

În anul 1990, Sinclar și colaboratorii au reușit să restrângă și mai mult aria de investigare, identificând în regiunea distală a brațului scurt al cromozomului Y de la om, adiacentă cu PAR-Y 1, gena SRY (*sex region of Y*) lungă de 2001 pb (2,1Kb).

În același an, Gubbay și colaboratorii au identificat la șoarece gena omoloagă: Sry.

Gena SRY/Sry are toate atributele care permit asimilarea sa cu TDF/Tdy:

1) se exprimă specific în testicul. Produsul proteinic al genei a fost identificat în testiculele organismului adult și în embrionul de șoarece, în gonadele în curs de evoluție spre testicule. Proteinele respective sunt factori de transcripție și sunt rezultatul activității genei *SRY*, de la om, și a genei *Sry*, de la șoarece, caracterizându-se printr-un domeniu activ de 80 de aminoacizi, denumit HMG (*high mobility group*). Acest domeniu HMG reprezintă locul de legare de ADN;

2) gena *SRY* este prezentă la numeroși bărbați XX(60%). Gena *Sry* este deletată la șoarecii XY, cu fenotip femel;

3) injectarea într-un zigot de șoarece XX a unui fragment de ADN conținând gena *Sry* a determinat ca embrionul respectiv să devină un mascul funcțional.

S-a considerat că gena SRY ar trebui să fie înalt conseravtă, la diverse specii de mamifere. Surprinzătoare a fost însă constatarea că secvențele genei SRY la om, șoarece și marsupiale sunt puțin conservate. Întrega activitate sex-determinantă a genei SRY este conservată la nivelul casetei HMG, o concluzie care este sprijinită de faptul că aproape toate substituțiile de aminoacizi, constatate în proteinele SRY mutante, de la femeile XY, au loc în această regiune HMG.

De asemenea, modelele de exprimare ale genei SRY sunt diferite la diferite specii. La șoarece, *Sry* se exprimă în gonadele indiferente, la masculi, în ziua 11,5 *post coitum*, adică atunci apar primele semne histologice ale diferențierii testiculare. De asemenea, Sry se exprimă, în testiculele organismelor adulte, dar sub formă de transcripte circulare netraduse.

Gena umană SRY este transcrisă la un nivel scăzut, în multe țesuturi embrionare, iar la adulți exprimarea se face numai în testicule. În contrast cu modelele de exprimare restrânse de la șoarece și om, SRY se exprimă ubiquitar la marsupiale. Semnificația prezenței transcriptelor SRY în alte țesuturi în dezvoltare, decât testiculul, este neclară. Să aibă SRY, la marsupiale, o altă funcție decât cea de determinism testicular?

Mecanismul prin care SRY acționează pentru a iniția dezvoltarea testiculelor este și mai puțin lămurit. Din cauza acțiunii pozitive a factorului de determinare testiculară în promovarea dezvoltării mascule, se consideră că gena SRY funcționează prin activarea transcripției genelor care participă la diferențierea testiculelor.

Totuși, factorul de determinare testiculară ar putea opera și prin reprimarea unei gene care este dominantă asupra genei SRY. De fapt, există specii de rozătoare cărora le lipsește gena SRY. Astfel, *Ellobius lutescens* și *E. tancrei* sunt specii care etalează o dezvoltare sexuală normală, deși le lipsește cromozomul Y și nu au o genă omologă genei SRY.

Aceste observații sugerează că gena SRY acționează numai ca un comutator care inițiază dezvoltarea masculă și contribuie foarte puțin la diferențeierea masculă propriu zisă.

De aceea, concluzia a fost că există și alte gene care acționează pe traiectul căii sex-determinante, unele în amonte și altele în aval de gena SRY/Sry. Aceste gene pot fi situate pe oricare alt cromozom decât pe gonozomul Y și se exprimă în mod egal la femele și masculi. Dovezi genetice din patologia sexuală a șoarecilor și a omului au indicat existența unor gene sexualizante a căror acțiune precede sau succede acțiunea genei SRY/Sry, cele mai multe situate pe autozomi, dar unele și pe cromozomul X.

11. GENA AMH/AMH

În calea determinismului sexului mascul, gena AMH/Amh face parte din grupul de gene care acționează în aval de gena SRY/Sry. Gena AMH a fost cartografiată la om în cromozomul 9q13, iar la șoarece aceasta este localizată în cromozomul 7. Produsul proteinic al genei autozomale AMH/Amh, hormonul antimullerian, determină la masculi regresia activă a conductelor mulleriene. Odată celulele Sertoli diferențiate, sub acțiunea genei SRY/Sry, genele implicate în funcția acestor celule devin active și printre ele este și gena *AMH/Amh*.

„In vitro“, adăugarea de hormon antimullerian masculinizează ovarul fetal de șobolan prin inducerea unor structuri asemănătoare cordoanelor testiculare, iar la șoarecii masculi, absența hormonului antimullerian determină dezvoltarea lor ca pseudohermafrodiți. Deși aceste rezultate sugerează că gena *AMH/Amh* este implicată în morfogeneza gonadelor, șoarecii *knockout* pentru gena *Amh* demonstrează o dezvoltare normală a testiculelor.

În mod clar, în prezent, se consideră că acțiunea hormonului antimullerian, și deci a genei respective, declanșează începutul fazei hormonale a diferențierii macule. De aceea, reglarea exprimării genei *AMH/Amh* este de importanță majoră, pentru înțelegerea determinismului sexelor la mamifere.

În ultimii ani, s-au realizat progrese majore în înțelegerea modului de acțiunea al *AMH*, prin izolarea celor doi receptori ai săi tipul I și II, ultimul tip servind la legarea ligandului, iar primul tip asigurând transmiterea semnalului. Interacțiunea dintre *AMH* și receptorul său II este foarte specifică și reglarea activității genei *AMH/Amh* trebuie să fie strânsă pentru a asigura o diferențiere adecvată a sexului mascul.

Se cunosc trei proteine care interacționează cu promotorul genei *AMH/Amh* pentru á-i regla exprimarea sa. Ele sunt produsele genelor *SF-1, WT-1* și *SOX 9.*

12. GENA SF-1/SF-1

Inițial, gena pentru factorul steroidogenic 1 (SF-1/Sf-1) a fost considerată doar ca o activatoare a genelor implicate în biosinteza steroizilor din diferite celule producătoare de hormoni steroizi, ea reglând în primul rând activitatea genei StAR, cu rol esențial în steroidogeneza gonadică și suprarenaliană, pentru că promotorul acestei gene are un loc de legare pentru polipeptidul *SF-1*. *SF-1* este un membru al familiei de receptori nucleari orfani și acționează ca un factor de transcripție.

La om, gena *SF-1* a fost cartată în cromozomul 9q33, iar la șoarece în cromozomul 2.

Existența unei legături între gena *SF-1* și gena *Amh* este clară. Exprimarea genei *Amh* la șoarece, în celulele Sertoli, depinde de prezența unei secvențe CCAAGGTCA care este secvență de recunoaștere a receptorului nuclear *SF-1*. Atât transcriptul *SF-1*, cât și transcriptul *Amh* pot fi detectate la maculi în perioada imediat următoare formării testiculelor, în timpul regresiei conductelor Muller. Din contră, în gonadele femele, nivelul transcriptelor *Sf-1* scade puternic în această perioadă. Aceste observații arată că *Sf-1* este un reglator major pozitiv al exprimării genei *Amh*, în timpul procesului de regresie a conductelor Muller.

Exprimarea genei *Sf-1* începe în gonadele primordiale, înainte ca proteina *SRY* să fie detectată, atinge un vârf de exprimare și apoi continuă să se exprime și după ce proteina *SRY* nu mai este detectată. Deci nu există o interacțiune directă între *SF-1* și *SRY.*

S-a reliefat că gena *SF-1/Sf-1* are cel puțin trei roluri importante în dezvoltarea sexuală a omului și a șoarecelui:

1) în organizarea progonadei, înainte de exprimarea genei *SRY/Sry* ;

2) în diferențierea masculă, prin reglarea probabilă a degenerării conductelor mulleriene, datorită interacțiunii sale cu *AMH/Amh* ;

3) în reglarea sintezei steroizilor sexuali în celulele Leydig și celulele tecale.

În acest fel, se poate spune că gena *SF-1/Sf-1* intervine în calea determinismului sexului mascul, atât în amonte cât și în aval de exprimarea și acțiunea genei *SRY/Sry*.

Gena WT-1/Wt-1

Gena WT-1 (*Wilms tumour gene 1*) își exercită funcția sa reglatoare asupra promotorului genei *AMH* prin interacțiune cu SF-1, pentru a modula legarea sa de ADN. Mutațiile genei *WT-1* sunt implicate la om în patru sindroame de inversare a sexului XY: tumora Wilms, sindromul WAGR, sindromul Frasier și sindromul Denys-Drash. Aceste implicări sunt posibile datorită faptului că gena *WT-1* este complexă, codificând prin episaj alternativ 16 produși proteinici diferiți.

Rolul genei *WT-1/Wt-1* în dezvoltarea gonadelor a fost relevat de șoarecii *knockout* cu mutații nule ale genei murine *Wt-1*.

Lipsa de dezvoltare a gonadelor la șoarecii homozigoți pentru mutația nulă a genei *Wt-1*, determinată de degenerarea gonadică în timpul embriogenezei, arată că această genă poate să nu fie o genă sex-determinantă „*per se*". În schimb, ea ar putea fi necesară pentru agregarea țesutului gonadic din mezonefros, pentru stabilizarea gonadei indiferente bipotențiale și pentru realizarea unui mediu biochimic adecvat, în care gena *Sry* să poată acționa în angajarea celulelor în direcția masculinizării.

Produsul proteinic *WT-1* se asociază și acționează sinergic cu SF-1, pentru a promova transcripția genei *AMH-Amh*. Deteriorarea acestei funcții ar putea fi resposabilă de pseudohermafroditismul masculin asociat cu sindromul Denys-Drash.

În concluzie, modelul de exprimare și fenotipul șoarecilor homozigoți pentru mutația nulă a genei *WT-1*(lipsa țesutului gonadic) demonstrează că gena normală, care este și o antioncogenă, își exercită acțiunea în amonte de gena *Sry*, dar nu interferă cu migrarea normală a celulelor germinale primitive în gonadele primordiale.

13. GENELE SOX/SOX

Genele *SOX/Sox* alcătuiesc o familie de gene a căror produse polipeptidice manifestă în domeniul HMG o similitudine mai mare de 50% (între 50-90%) în privința celor 79 aminoacizi componenți.

Peste 20 de gene *SOX/Sox* au fost identificate, atât la vertebrate, cât și la nevertebrate, dintre care gena *SOX3*, în cromozomul X, celelalte fiind situate în autozomi.

Cea mai mare parte din aceste gene nu exercită vreun rol în determinismul sexelor, doar gena *SOX 9* are în mod clar acest rol. Mutații ale acestei gene determină la om displazia campomelică (Cd) și inversarea autozomală a sexului (SRA-1). Gena *SOX 9* a fost localizată în porțiunea distală a cromozomului 17 (17q24.3-q25.1).

Mutații ale genei *SOX 9* au fost detectate la 2/3 din pacienții cu CD, fără translocații, ceea ce a sugerat că gena este implicată indubitabil în realizarea fenotipului displaziei campomelice. Pe de altă parte, o proporție mare de pacienți cu CD prezintă inversarea sexului XY, demonstrând rolul important al genei *SOX 9* nu numai în dezvoltarea scheletului, dar și în determinismul sexelor.

La șoarece, gena *Sox 9* este exprimată în timpul condrogenezei embrionare, în crestele genitale și în gonada indiferentă. Acest model de exprimare sugerează că gena *Sox 9*, cel puțin la șoarece, are un rol sex-determinant în aval de *gena Sry*, în diferențierea și dezvoltarea celulelor Sertoli.

S-a constatat că în legarea sa de promotorul genei *AMH/Amh*, polipeptidul *SF-1* cooperează cu produsul genei *Sox 9*, ambii factori de transcripție fiind implicați în exprimarea genei *AMH/Amh*, datorită interacțiunii dintre ei, deși produsul genei *Sox 9* poate acționa și singur cu promotorul genei *Amh*. Într-adevăr, gena *Sox 9* se exprimă în crestele genitale ale embrionului XY, în perioada în care gena *Amh* este activă și continuă să se exprime în celulele Sertoli, în tot timpul dezvoltării până la vârsta adultă. Contrar lui *Sf-1*, *Sox 9* nu se exprimă în celuelele mezenchimale și celulele Leydig și produsul său polipeptidic nu este prezent în crestele genitale ale embrionului XX, în vârstă de 11,5 zile post coitum. Astfel, *SOX 9* a fost identificată ca un partener de interacțiune cu *Sf-1*, putând fi implicată în exprimarea în celulele Sertoli a genei *AMH/Amh*, în timpul embriogenezei.

De aceea, se crede că *SOX 3* și *SRY* au fost odată una și aceeași genă și că divergența genei *SRY* și achiziția de către ea a rolului de determinant testicular ar fi precedat diferențierea cromozomilor X și Y.

14. GENA DAX-1/DAX-1 SAU AHC/AHCH

În anul 1978, prima indicație că o genă X-specifică este implicată în determinismul sexelor la om a fost furnizată de identificarea unei familii în care membrii ei, de constituție genetică 46,XY, cu disgenie gonadică, aveau o transmitere apparent X-lincată a afecțiunii. Ulterior, alte studii citogenetice au relevant existența la unii indivizi 46, XY, cu inversarea sexului masculin în sex feminin, a unui cromozom X anormal, asociat cu un cromozom Y, cu gena *SRY* intactă.

Studiul acestor pacienți a demonstrat că inversarea sexului rezultă din prezența a două copii active ale locusului denumit *DSS* (*dosage sensitive sex reversal*) din brațul scurt al cromozomului X. Un dozaj dublu al locusului *DSS* împiedică formarea testiculelor, deși gena *SRY* este prezentă și este funcțională. Dacă *DSS* nu este în doză dublă, se dezvoltă un fenotip masculin prin diferențierea normală a testiculelor. Acest lucru a sugerat existența unui rol al genei *DSS* în determinismul ovarului și stabilirii unei legături între formarea testiculelor și formarea ovarelor.

Regiunea *DSS* a fost localizată într-o zonă de 169kb din Xp21.2-p22.2 cu suprapunere peste locusul *AHC* (*adrenal congenital hypoplasia* -hipoplazia congenitală a corticosuprarenalelor). Secvențierea ADN din zona *DSS-AHC* a relevant prezența unei gene: *DAX-1*(*DSS-AHC critical region on the X*) care, ca și gena *SF-1*, codifică un membru al superfamiliei de receptori nucleari hormonali orfani. Gena este responsabilă de forma X-lincată a hipoplaziei congenitale a corticosuprarenalei (AHC) cu hipogonadism hipogonadotropic.

Gena *DAX-*, prin duplicație, interferă cu dezvoltarea normală a testiculelor, producând inversarea sexului XY, iar prin mutații punctiforme și deleții, determină subdezvoltarea corticosuprareanalei. De aceea, gena a început să fie denumită și *AHC* (*adrenal hypoplasia congenital gene*) pentru om și *Ahch* (*adrenal hypoplasia congenital gene homologue*) pentru șoarece.

S-a stabilit că *SF-1* activează gena *Ahch*, iar produsul proteinic al acesteia, *DAX-1*, inhibă activitatea transcripțională a genei *Sf-1*, prin intermediul unei interacțiuni de tip proteină-proteină, ceea ce sugerează că ele acționează într-o cale genetică comună.

Cu ajutorul șoarecilor transgenici, s-a demonstrat că deși s-a postulat că gena *Ahch* funcționează ca o genă determinantă a ovarului, pierderea funcției genei *Ahch*, la femele nu afectează diferențeirea ovarului și fecunditatea.

În schimb, la masculi, s-a dovedit că gena *Ahch* este esențială pentru desfășurarea gametogenezei; absența genei determină o degenerare progresivă a epiteliului germinal testicular și sterilitate.

În felul acesta, gena *Dax-1* sau *Ahch* nu este o genă determinantă a ovarului, ci este o genă antitesticulară, care se opune diferențierii testiculelor, dar apoi intervine în spermatogeneză.

15. GENA DMRT-1/DMRT-1

Gena *DMRT-1* (*double sex and mab 3 related transcription factor 1*) este implicată în diferențierea testiculelor la om, deoarece indivizii XY, cu această regiune genică deletată, etalează o mare frecvență a inversării sexului XY. Această genă a fost cartată la om în cromozomul 9p23.3-p24.1 și este o nouă genă candidată pentru calea determinismului sexelor la mamifere.

Gena *DMRT-1/Dmrt-1* este importantă și din punct de vedere evolutiv, deoarece ea are un domeniu de legare la ADN de tip similar cu cel evidențiat la produșii genelor sexualizante *mab3* , de la *C.elegans*, și *dsx* ,de la *D.melanogaster*.

16. GENA WNT-4

Odată ce celulele Sertoli s-au diferențiat, sub acțiunea produsului genei *SRY/Sry*, ele vor fi cele care vor direcționa dezvoltarea restului liniilor celulare din testicul, prin interacțiuni de tipul celulă-celulă și prin produsele secretate. Un astfel de candidat pentru acești factori de interacțiune este *Wnt-4* care face parte din familia *Wnt* a moleculelor proteinice de semnalizare celulară.

Gena *Wnt-4* se exprimă inițial în crestele genitale și mezonefros, dar pe măsură ce gonada se diferențiază și se dezvoltă, concentrația moleculelor produse de *Wnt-4* se reduce și dispare din testicule, dar se păstrează în cantitatea ridicată în ovare. Deoarece celulele Leydig încep să sintetizeze testosteron, odată cu formarea cordoanelor testiculare (la vârsta de 12, 5-13 zile *post coitum*, la șoarece), înseamnă că producția de testosteron, în aceste celule, este suprimată datorită prezenței moleculelor codificate de gena *Wnt-4*. Apoi *Sry* începe să acționeze și determină la masculi reprimarea activității genei *Wnt-4* și steroidogeneza se reia.

Mutații ale genei *Wnt-4* declanșează diferențierea celulelor Leydig, în gonadele femelelor afectate. De aceea, gena *Wnt-4* acționează ca un repressor al diferențierii mascule și este singura genă cu funcție demonstrată în calea determinismului ovarelor.

17. GENELE SEXUALIZANTE EVIDENȚIATE LA MAMIFERE SUNT PARȚIAL IDENTIFICATE LA REPTILE ȘI PĂSĂRI

O genă omoloagă genei *SRY/Sry*, de la mamifere, nu a fost încă identificată la reptile. În schimb, s-a constatat că alte gene, din cascada determinismului sexelor la mamifere, sunt prezente și la reptile. Astfel, au fost identificate: *SF-1, WT-1, SOX 9* și *AMH*.

Gena *WT-1* se exprimă în țesutul uro-genital, în stadiile de dezvoltatre embrionară, când funcționează dependența de temperatură, atât la temperaturile care produc masculi, cât și la temperaturile care produc femele. În același fel se exprimă și gena *SOX 9*. Sunt luate în considerare posibile interacțiuni ale genelor

SF-1, *WT-1*, *SOX 9* și *Amh* cu gena aromatazei, la reptilele cu *TSD*, constatându-se reprimarea genei *SOX* de către estrogeni, în timp ce exprimarea aromatazei crește intens.

La păsări, femela fiind heterogametică, s-a căutat să se determine dacă nu există un omolog aviar al genei *SRY* de la mamifere. Până în present la păsări, nu s-a identificat o astfel de genă omologă genei *SRY*, de la mamifere.

Totuși, în cromozomul Z al găinii domestice a fost localizată gena *DMRT-1* care este omologă structural cu gena *DMRT –1*, din cromozomul 9 al omului și care este implicată în procesul diferențierii sexuale. Această observație are la bază și faptul că există omologie de structură a genei *DMRT-1* cu genele masculinizante de la *C. elegans* (*mab 3*) și de la *D.melanogaster* (*dsx*). Gena *DMTR-1* din cromozomul Z al găinii este o genă candidată pentru a fi determinanta testiculelor la păsări, fiind în doză dublă, la masculi și în doză unică, la femele. Totuși, funcția moleculară a genei *DMRT-1* nu a fost încă elucidată.

Recent, o genă denumită *Wpkci* a fost localizată în regiunea distală nonheterocromatică de pe brațul scurt al cromozomului W, de la găină. Această genă este transcrisă activ într-un stadiu embrionar tipuriu și codifică o formă modificată a proteinei care interacționează cu proteinkinaza c. O genă omologă, *PKCI*, a fost clonată și localizată înbrațul lung al cromozomului Z.

Hori și colaboratorii (2000) au emis ipoteza implicării genei *Wpkc,i* în diferențierea sexului femel, la găină.

Alte gene cu impact asupra diferențierii gonadelor care au fost clonate și analizate la embrionii de găină, în vârstă de 4,5-8,5 zile au fost *SOX- 9*, *WT-1*, *SF-1*, *AMH*. Genele *SOX 9* se exprimă și la nivele mari la masculi și mai puțin la femele după vârsta de 6,5 zile. *AMH* se exprimă la nivele foarte scăzute în gonadele mascule, în ziua 5,5 de dezvoltare și apoi nivelele de exprimare cresc treptat.

În timp ce la mamifere exprimarea genei *AMH* este specifică pentru masculi, la păsări hormonul antimullerian este necesar doar pentru a realiza regresia conductului mullerian drept.

CAPITOLUL XX

ARHITECTURA MATERIALULUI GENETIC IN GAMETOGENEZA LA ANIMALE

1. PROTEINELE CROMOZOMALE ȘI ROLUL ACESTORA ÎN ASIGURAREA STRUCTURII ȘI FUNCȚIEI MATERIALULUI GENETIC ÎN GAMETOGENEZA

Structura cromatinei rezultă din interacția ADN cu proteinele cromozomale. Proteinele cromozomale sunt implicate în menținerea integrității structurale a cromozomului, protejarea ADN de acțiunea deoxiribonucleazelor și reglarea activității genice.

În timpul spermatogenezei, cromatina din celulele stem parcurge câteva tranziții dinamice care sunt adesea asociate cu schimbări importante în compoziția și structura sa, în cele mai multe cazuri, compoziția proteinelor cromozomale din stadiile finale ale spermatogenezei fiind total diferită de cea din stadiile inițiale. Aceste modificări compoziționale alterează semnificativ structura cromatinei. Ca urmare, aceasta devine înalt compactată, iar expresia genică este complet blocată în spermatozoizi.

Proteinele cromozomale din spermatozoizi prezintă o imensă variabilitate structurală. În ultimul timp s-au realizat importante progrese în caracterizarea fizică și chimică a acestor proteine la o mare varietate de organisme. Rezultatele acestor studii arată că, în ciuda enormei variabilități structurale, proteinele nucleare specifice spermatozoizilor pot fi grupate, în funcție de compoziția lor în trei categorii:

– Tipul H (*histone-type*) constă în proteine cu o compozitie în aminoacizi similară cu histonele din celulele somatice;

– Tipul P (*protamine-type*) constă în proteine cu masă moleculară mică (4.000 — 10.000 daltoni), bogate în arginină (conținut de arginină mai mare de 60%). În cursul spermatogenezei aceste proteine înlocuiesc aproape total histonele din celulele stem;

– Tipul PL (*protamine-like*) constă în proteine cu o compoziție de aminoacizi intermediară între tipurile descrise anterior. Conținutul în arginină și lisină este cuprins între 35-50% și, ocazional, poate fi chiar mai mare.

2. HISTONELE

Din punct de vedere chimic, histonele sunt proteine cu un puternic caracter bazic, deoarece 25% din aminoacizii constituenți sunt bazici, purtători de sarcini pozitive (arginină, lizină și histidină). Ele sunt complet lipsite de triptofan, fenilalanină și tirozină. Din cauza naturii lor bazice, histonele pot fi extrase ușor cu acid clorhidric diluat sau cu acid sulfuric.

Histonele sunt alcătuite dintr-o singură catenă polipeptidică.

După conținutul în arginină și lizină, histonele cromozomale sunt clasificate în cinci clase: H1 (bogate în lizină), H2A și H2B (moderat bogate în lizină), H3 și H4) relativ bogate în arginină); în cadrul fiecărei clase, există câteva subtipuri care diferă prin 1-2 aminoacizi. Există și histonele H5 și H6, prezente numai în nucleii eritrocitelor de păsări (hematii circulante nucleate) unde înlocuiesc histona H1.

Proprietățile fizico-chimice ale histonelor

Histona H1 este cea mai mare (GM=21.000 daltoni), conține circa 215 aminoacizi și se prezintă sub formă de monomer; lizina se găsește în cea mai mare proporție (27%). Prezintă cea mai mare variabilitate de secvență și este implicată în interacțiunile cu componentele variabile ale cromatinei (non-histone, regiuni variabile ale altor histone). Fiind legată de ADN linker dintre doi nucleozomi, poate fi ușor îndepărtată prin digestie enzimatică.

Histona H2A este formată din 129 de aminoacizi, are GM=14.000 daltoni și se prezintă sub formă de oligomeri. Conține 11% lizină, 9% arginină și leucină în cantitate mare.

Histona H2B conține 125 de aminoacizi, are GM=13.775 daltoni și formează oligomeri. Conține 16% lizină, 6,5% arginină și un procent ridicat de serină și prolină.

Histona H3 este formată din 135 de aminoacizi, are GM=15.320 daltoni și conține 15% arginină, 12% lizină, fiind singura fracție în compoziția căreia intră și cisteina.

Histona H4 este formată din 102 aminoacizi și are GM=11.280 daltoni. Este bogată în arginină (14%) și glicină (15%). H3 și H4 formează un tetramer (2 H3 — 2 H4), care împreună cu oligomerii H2A și H2B construiesc cilindrul turtit, (platisomul) proteinic al nucleosomului.

H4, fiind cea mai mică histonă, are descifrată complet secvența de aminoacizi: regiunea terminală NH_2 cuprinde cei mai mulți aminoacizi bazici, având și un caracter bazic foarte pronunțat, pe când regiunea terminală COOH reprezintă segmentul hidrofob și este numai ușor bazică. Se consideră că regiunea terminală NH_2 este implicată în legarea la ADN, iar regiunea terminală COOH se implică în legături interhistonice sau cu alte componente ale cromatinei.

Conținutul histonelor în aminoacizi bazici (arginină, lizină, histidină), purtători de sarcini pozitive, explică legarea lor la ADN. Aceasta se realizează prin formarea de punți ionice (electrostatice) între grupele fosfat încărcate negativ ale ADN și grupele amino (NH_2) încărcate pozitiv ale catenelor laterale ale aminoacizilor bazici din catena polipeptidică a histonelor. Intensitatea legăturii la ADN a diferitelor fracții de histone este diferită. Astfel, lizina se leagă preferențial al perechile A-T, în timp ce arginina se leagă preferențial la perechile G-C. Aceste legături se realizează la nivelul adânciturii mari, în timp ce adâncitura mică prezintă situsuri de recunoaștere pentru ARN-polimerază.

Componența bazică a histonelor protejează ADN de denaturarea termică. Acest rol îl îndeplinesc cationii care reduc forțele de repulsie ce apar între grupările fosfat cu sarcini negative. Temperatura de denaturare termică a ADN este în funcție de concentrația cationică a moleculelor de histone, acestea fiind policationi.

Histonele suferă anumite modificări chimice cum sunt: metilarea, acetilarea și fosforilarea diferiților aminoacizi. Aceste modificări duc la schimbarea sarcinii moleculelor histonice și sunt corelate cu activitatea genelor, cu replicarea ADN și cu diferențierea celulară.

Metilarea are loc specific la nivelul aminoacizilor bazici (arginina, lizina și histidina). Grupările metil se găsesc în histone sub formele : ε-N-metillizină, ε-N-trimetillizină, ε-N-metilarginină, și 3-metilhistidină. Incorporarea grupării metil este specifică. În transferul grupărilor metil intervin enzime de metilare, care sunt de origine nucleară. Enzima specifică metilării histonelor este metilaza III. Ca donor de grupări metil servește S-adenozinmetionina.

Efectele metilării histonelor sunt următoarele: crește bazicitatea aminoacizilor metilați și, prin urmare, crește interacțiunea dintre histone și ADN; crește hidrofobicitatea și se amplifică interacțiunile hidrofobe ale histonelor cu alte proteine; induce modificări sterice. Metilarea este corelată cu scăderea activității de transcriere.

S-a constatat că buclele lampbrush sunt complet lipsite de 5-metil-citozină, ceea ce denotă o intensă activitate transcripțională.

Acetilarea are loc la nivelul serinei și al lizinei. Ca donor de grupări acetil servește acetil-CoA. Acetilarea lizinei se realizează posttranslațional și duce la formarea aminoacidului modificat ε-N-acetillizină, iar acetilarea serinei are loc simultan cu translația și duce la formarea aminoacidului modificat N-acetilserină. N-acetilserina apare mai mult în histonele H1, H2A și H4.

Acetilarea lizinei are rol în aspectele dinamice ale structurii și funcției cromozomului. Se presupune că acetilarea este corelată cu creșterea activității genice de sinteză ARN, dar nu se cunoaște mecanismul.

Fosforilarea are loc la nivelul serinei și treoninei. Prin fosforilare, sarcina negativă a histonelor crește, facilitând desprinderea lor de ADN. Histona H1 suferă fosforilarea maximă în faza S a ciclului celular, având ca rezultat derepresia unor regiuni din genom, în vederea transcrierii. Ca donor de grupări fosfat este ATP, iar enzimele de fosforilare sunt proteinkinazele și fosfatazele.

Modificările histonelor, cu excepția metilării, sunt asociate cu evenimente cromozomale distincte și sunt schimbări reversibile. Fosforilarea și acetilarea influențează interacțiunea histonelor cu celelalte componente cromozomale. Modificarea sterică a histonelor este consecința faptului că grupările fosfat și acetil sunt voluminoase. Regiunile de prindere sunt regiuni foarte voluminoase, fiind cele mai afectate de modificările amintite. Deci, metilarea, fosforilarea și acetilarea afectează, în esență, interacțiunea ADN — histone și prin aceasta structura fibrei nucleozomale.

Histonele sunt proteine de structură cu rol de stabilizator al fibrei de cromatină. ADN nativ este oarecum instabil, deoarece apar forțe de repulsie între grupările fosfat încărcate negativ, ceea ce duce la extensia moleculei și, eventual, la separarea catenelor. Între grupările fosfat ale catenelor de ADN și grupările NH_2 ale histonelor se formează legături ionice, care dau stabilitate moleculei.

În afara rolului structural, histonele îndeplinesc și funcția de represori generalizați în reglajul genetic. Asocierea histonelor cu ADN imprimă starea condensată a cromatinei, deci împiedică transcrierea ADN.

Cromatina celulelor spermatice este supusă unor reranjamente structurale în timpul diferențierii spermatidei în spermatozoid matur. În timpul stadiului haploid din spermatogeneza mamiferelor, histonele sunt înlocuite treptat mai întâi de proteine de tranziție și apoi de protamine.

Fracția histonică din cromatina celulelor spermatice este compusă din subtipuri specifice țesutului testicular, asemănătoare cu izoformele histonice care se găsesc în țesuturile somatice.

Pattern-urile subtipurilor pentru toate clasele histonice (cu excepția histonei H4) se modifică în timpul spermatogenezei mamaliene într-o manieră specifică, depinzând de stadiul de dezvoltare al spermatocitelor. Aceasta implică existența mecanismelor de control care reglează expresia genelor pentru subtipurile histonice în celulele specifice. Acest control poate fi exercitat la nivel transcripțional (exemplificat prin studiul funcționalității promotorului H1t). Reglarea poate avea loc de asemenea, și la nivel posttranslațional, prin poliadenilarea unei fracții de ARNm din celulele spermatice (Doehner, D. & Drabent, B., 1995).

Pattern-urile proteinelor histonice au fost analizate în timpul spermatogenezei la un larg spectru de organisme eucariote inferioare și superioare (tabel 1).

Tabelul 1. Expresia genelor histonice în spermatogeneza mamiferelor. Prezența subtipurilor histonice în diferitele stadii de dezvoltare ale spermatocitelor înainte de înlocuirea acestora de proteinele de tranziție și, în final, de protamine.

Subtipul histonic	Stadiul celular în care este prezentă histona
H1a-e	toate stadiile; sunt înlocuite în parte, de către H1t în spermatocitele aflate în pachiten
$H1^0$	Spermatogonii (după acest stadiu, concentrația acestora începe să descrească)
H1t	Spermatocitele pachitenice
H2A	toate stadiile, în parte înlocuite de TH2A
H2A.X	Spermatogonii
H2A.Z	Spermatogonii, se observă o ușoară creștere în spermatocitele pachitenice
TH2A	Spermatocitele pachitenice, parțial înlocuind H2A
H2B	toate stadiile, în mare parte înlocuite de TH2B; există un subtip specific în spermatide
TH2B	Spermatocitele pachitenice
H3	toate stadiile
TH3	Spermatogonii; absentă în stadiile târzii
H3.3	toate stadiile până la spermatide; prezentă în special în spermatogonii
H4	toate stadiile; în spermatocitele pachitenice gena pentru H4 este transcrisă împreună cu gena pentru H1t

3. SUBTIPURILE HISTONICE TESTICULARE

Familia de histone linker H1 cuprinde câteva variante izoforme. Cele mai detaliate analize ale complementului H1 au fost realizate pe cromatina umană și murină de la câteva tipuri de celule și țesuturi. La om au fost descrise cinci tipuri genice pentru histona H1, în plus față de genele ce codifică $H1^0$, care este o histonă întâlnită doar în tipurile celulare înalt specializate, și H1t care se exprimă doar în celulele testiculare (este o genă înalt conservată). Prezența proteinei H1t este limitată la celulele liniei germinale mascule, ea nefiind o variantă generală meiotică.

În spermatocitele pachitenice și în stadiile târzii, H1t se află în cantitate foarte mare.

Huh și colaboratorii au descris prezența unei perechi de gene cu exprimare testiculară, constând într-o genă H2A și o genă H2B. Aceste gene ar putea codifica pentru subtipurile TH2A și TH2B (proteine cu localizare testiculară). În plus, au fost descrise două subtipuri H2A cu replicare independentă — H2A.Z și H2A.X. H2A.X este abundentă în cromatina testiculară, în timp ce H2A.Z este uniform răspândită în cele mai multe țesuturi somatice.

Un subtip testicular de histonă H3 (TH3) a fost izolat din testiculul de șobolan. Compoziția sa unică de aminoacizi (incluzând 3 resturi de cisteină) indică diferențe structurale comparativ cu celelalte subtipuri H3 cunoscute, dar încă nu a fost identificată gena pentru TH3, în nici un genom mamalian.

Subtipul H3.3 a fost găsit a fi exprimat în timpul spermatogenezei, atât în stadiul de spermatidă, cât și în stadiile timpurii ale spermatogenezei.

Histona H4 este cea mai conservată dintre toate clasele de histone. Secvența sa de 102 aminoacizi a fost menținută la toate speciile de mamifere.

În diferitele stadii ale spermatogenezei se modifică pattern-ul histonic. Pattern-ul histonei în diferitele tipuri de celule somatice sau în celulele germinale nu este uniform, variind în compoziția subtipurilor H1. La numeroase specii de mamifere au fost descrise cinci subtipuri histonice H1 (H1a-e).

În cazul subtipurilor histonei H1, s-a constatat că, deși H1t este mai bogată în arginină (arginina este implicată în capacitatea de condensare a fibrei de cromatină) are o capacitate mai mică de condensare decât celelalte subtipuri H1. Mai degrabă H1t poate avea un efect de activare în cromatina celulelor germinale, în curs de diferențiere, decât de represie a activității nucleare (Doenecke, D. & Drabent, B., 1995).

În timpul profazei meiotice au fost detectate schimbări majore și în compoziția clasei de histone H2A/H2B. Ambele subtipuri TH2A și TH2B sunt detectate mai întâi în spermatocitele pachitenice de șobolan și șoarece. Într-o bancă de ADNc, realizată pe baza ARN din spermatide, a fost observată o secvență ADNc H2B similară cu o altă secvență genică H2B de șoarece dar codificând pentru 12 aminoacizi adiționali, din care 7 hidrofobi. Analiza Northen blotting, cu ARN din alte țesuturi, a demonstrat că acest transcript este specific țesutului testicular. Similar, a fost detectat un ARNm H2A, în spermatidele de șoarece.

Tranziția histonelor spre protamine, în cursul spermatogenezei umane nu constă într-o înlocuire totală a histonelor. Aproximativ 15% din ADN-ul din spermatozoizi pare a rămâne asociat cu miezul histonic, în special cu H2A, H3.1, H3.3

și H4 care este înalt acetilată. În contrast cu acestea, nu a fost detectată histona H1 în cromatina spermatozoidului matur.

Schimbarea gradată a histonelor liker și a celor din miezul nucleozomal pe parcursul dezvoltării celulelor germinale mascule, modificarea morfologiei cromatinei și a activității genice, atribuie un rol funcțional important subtipurilor histonice.

Au fost observate modificări posttranslaționale ale histonelor din stadiul de spermatide. Cea mai impresionantă modificare a histonelor în timpul spermatogenezei este hiperacetilarea acestora.

Această modificare a structurii histonei H4 este corelată cu un spectru larg de procese celulare, incluzând controlul transcripțional și asamblarea cromatinei. Hiperacetilarea H4 are loc în spermatidele în curs de elongare. Acesta este stadiul în care are loc înlocuirea histonelor de către proteinele de tranziție.

4. PROTAMINELE

În timpul maturării spermatozoidului, histonele sunt înlocuite cu un grup de proteine înalt bazice, cu greutate moleculară scăzută (4.000-10.000 daltoni), bogate în arginină, denumite **protamine.** Deoarece primele studii pe aceste proteine specifice spermatozoidului s-au făcut pe material izolat din specii diferite de pești, ele au primit denumiri ce decurg din numele speciilor: *Salmon* — salmine, *Salmo irideus* — iridine.

În contrast cu structura înalt conservată a histonelor, pe parcursul evoluției, proteinele bazice specifice spermatozoidului variază enorm între specii. Protaminele de pește conțin 30-33 de aminoacizi, sunt foarte bogate în arginină (până la 75% din aminoacizii lor), dar lipsite de lizină; cele de la *Bufo* sunt de asemenea, bogate în arginină. Protaminele de la mamifere sunt neobișnuite deoarece conțin și resturi de cisteină. De exemplu, din sperma de taur s-a izolat o protamină bogată în arginină, de 6.200 daltoni, care conține 6 resturi de cisteină. Acestea par să fie implicate în formarea punților disulfhidrice pentru a produce o structură foarte compactă, în interiorul spermatozoidului.

Protamina 1 de la șoarece conține 50 aminoacizi, din care 29 sunt reprezentați de arginină. Există un singur tip de protamină în general, dar la om au fost identificate 2-3 tipuri, codificate de gene diferite.

Protaminele sunt sintetizate în citoplasma spermatidelor după care se deplasează în nucleu pentru a înlocui histonele.

Înlocuirea histonelor cu protamine nu se realizează direct, ci are loc o înlocuire gradată a acestora. Inițial, histonele bogate în lizină sunt înlocuite cu histone bogate în arginină (proteine de tranziție). Ulterior, histonele bogate în arginină sunt înlocuite cu protamine.

În comparație cu modelul nucleozomal de legare a histonelor, modelul de legare a protaminelor atașate șanțurilor minore ale dublului helix ADN, asigură o căptușire aproape completă a ADN, cu foarte puține zone libere. De aceea, față de nucleii celulelor somatice, în nucleii spermatozoizilor se pierde structura nucleozomică și superhelicitatea negativă, câștigându-se o altă organizare specifică.

5. COMPONENTELE PROTAMINE-LIKE

Sunt proteine cu o compoziție de aminoacizi intermediară între tipurile descrise anterior. Conținutul în arginină și lizină este de 30-50% și ocazional poate fi chiar mai mare.

În cele mai multe cazuri, aceste proteine pot fi structural înrudite cu histona H1.

În stadiile finale ale spermatogenezei, proteinele PL (*protamine-like*) prezintă un grad semnificativ de heterogenitate structurală cu mase moleculare cuprinse între 5.000 și 30.000 daltoni.

Proteinele PL au fost detectate în spermatozoizii maturi de la numeroase specii de moluște. Domeniile non-globulare N și C terminale ale acestor molecule sunt extrem de variabile.

David Bloch (1969) a publicat primul catalog al proteinelor specifice spermatozoizilor și a anticipat importanța filogenetică a acestui grup de proteine. El nota: „... asemănările dintre proteinele intermediare ale spermatozoizilor maturi la organisme aflate pe o treaptă filogenetică inferioară și proteinele intermediare din spermatide la specii de *Loligo* și *Salmo* (care ambele conțin protamine în spermatozoizii maturi) sugerează o relație între ontogenie și filogenie." Deși relația precisă între proteinele intermediare din timpul dezvoltării spermatozoizilor și proteinele *protamine-like* nu au fost încă bine stabilite, ipoteza lui Bloch se dovedește a fi un excelent model pentru încadrarea biochimică a spermatogenezei într-un context filogenetic.

6. ARHITECTURA MATERIALULUI GENETIC ÎN OVOGENEZA. -FENOTIPUL CROMOZOMAL LAMPBRUSH-

În 1881, W. Flemming a descris în celulele ovariene de la *Ambystoma mexicana* existența unui tip particular de cromozomi. Zece ani mai târziu, în 1892, ei au fost descoperiți de către Rückert, în ovocitele primare de la rechinul *Pristiurus*, numindu-i cromozomi *„lampencylinderputzer“* (*în perie de sticlă de lampă*). Denumirea acestor cromozomi este *lampbrush*. În limba franceză ei se numesc „chromosomes en encouvilion“ sau cromozomi *„en brosse pour lampes“*. Profesorul Ioan Steopoe i-a denumit „cromozomi plumoși“.

Cromozomii lampbush pot fi găsiți în ovocitele primare atât la animalele vertebrate, cât și la nevertebrate, în stadiul de diploten prelungit al primei diviziuni meiotice, dar și în spermatocitele de la *Drosophila hydei*.

În spermatocitele de *Bombyx mori,* Gavrilă (1984) a descris în microscopia electronică complexe sinaptonemale și cromozomi cu aspect ce amintește de fenotipul cromozomal lampbush. Dar, morfologia lampbrush tipică este întâlnită la cromozomii din stadiul de diploten al ovogenezei amfibienilor urodeli (*Triturus* și *Salamandra*)

Cromozomii lampbush au fost descriși la Chaetognate, Mollusca, Crustacea, Insecta, Echinoderma, Selacieni, Amphibia, Reptilia și Aves. De asemenea, și în ovocitele umane aflate în stadiul de dictioten au fost descriși cromozomi lampbush.

Cromozomii lampbush ating mai ales la Urodele precum *Salamandra salamandra* și *Triturus viridescens* lungimi foarte mari, de circa 1 mm, dar cu un diametru foarte mic, la limita vizibilității în microscopia optică (fig. 1, 2, 3).

Este posibil ca acești cromozomi să reprezinte o formă extremă a unui fenomen meiotic general în care cromozomii parcurg un proces incomplet de despiralizare.

Tipul lampbush este specific pentru stadiul de diploten al primei profaze meiotice, și este reversibil, după aceasta, parcurg un proces de pliere sau condensare, luând forma cromozomilor obișnuiți

Acești cromozomi se află sub formă de bivalenți în diplotenul meiozei, fiind deci cromozomi omologi împerecheați, ce prezintă din loc în loc chiasme.

Din axa cromozomală dublă se desprind în unghi drept bucle de la nivelul cromomerelor, ce sunt conectate prin fibre intercromomerice (fig. 8)

Mărimea și distibuția cromomerelor pe fibra de cromatină sunt caracteristici de specie (diametrul lor având o medie de 0,25-2μm).

Fiecare cromomeră prezintă două sau un multiplu de două bucle asociate la ea.

Unele bucle nu se văd, dar altele ajung la 200μm, lungimea medie fiind de 10-15 μm.

Frecvent, aceste bucle prezintă o axă fină care reprezintă probabil un dublu helix ADN, din care perpendicular sunt orientate fibrile incluse într-un matrix compus din ARN și proteine (particule ribonucleoproteinice = RNP). Aceste bucle au formă variabilă și diferă in dimensiuni de la o cromomeră la alta și acest aspect poate fi util în alcătuirea hărților citologice ale cromozomilor lampbrush (fig. 9)

În general, există o corelație indirectă între cromomere și dimensiunile buclelor.

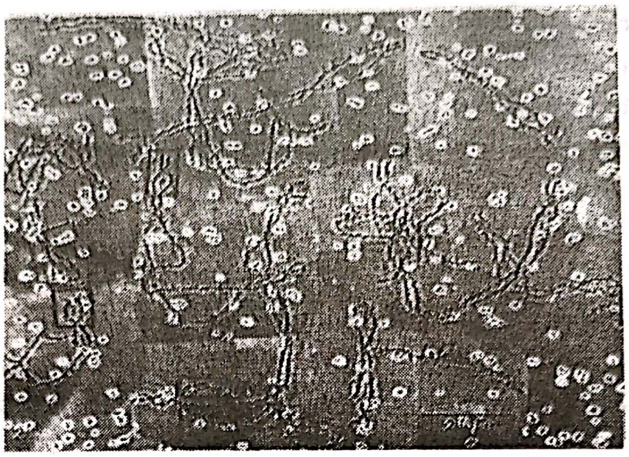


Fig. 1 — Complementul cromozomal lampbrush la *Triturus viridescens* (după Barsachi G. și colab., 1970).

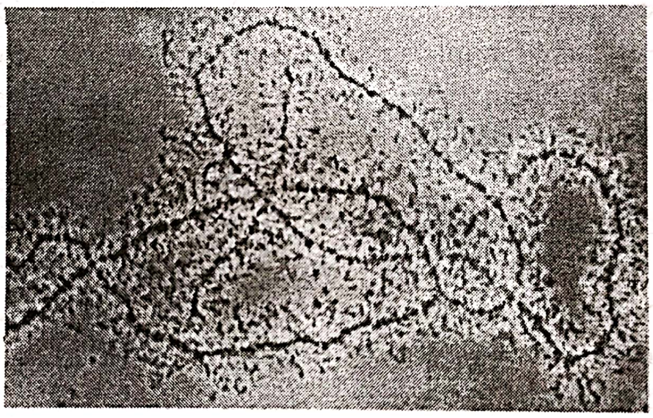


Fig. 2 — Cromozom lampbrush din ovocita de *Triturus viridescens* izolat în soluție salină și vizualizat la microscopul în contrast de fază (după J. G. Gall, 1966).

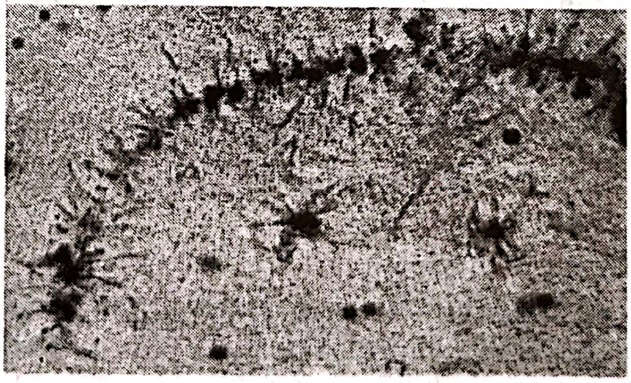


Fig. 3 — Profile lampbrush la *Salamandra salamandra* (după Steopoe și Gavrilă, 1986).

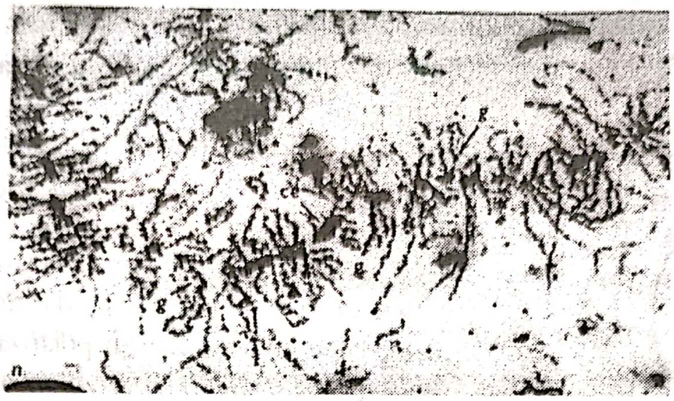


Fig. 4 — Cromozom lampbrush prezentând axa cromozomală cu structură cromomerică și bucle laterale proiectate perpendicular din acesta. Ce= centromer; n= nucleol (după Callan, 1978).

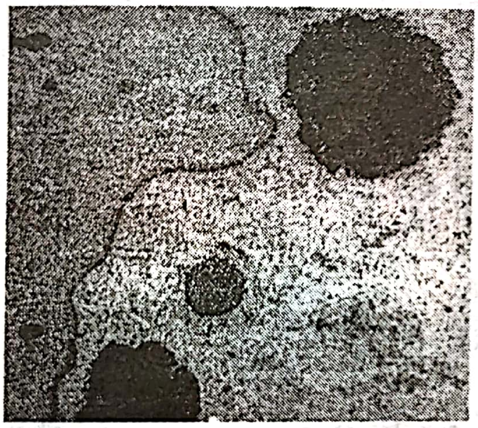


Fig. 4 — Ovocit de *Triturus cristatus*. Nucleoli extracromozomali în dezagregare cu eliberare de particule RNP (după Gavrilă și Mihăescu, 1984).

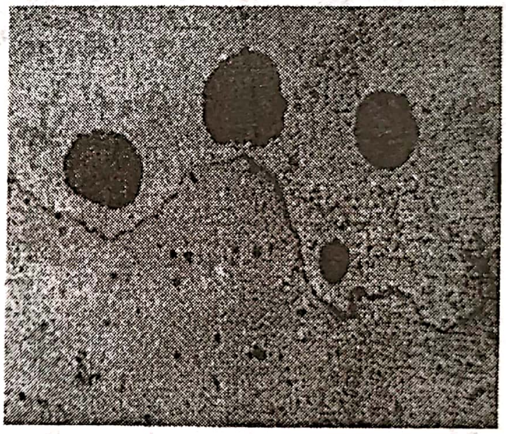


Fig. 6 — Multipli nucleoli extracromozomali în ovocite de *Triturus cristatus* (după Gavrilă și Mihăescu, 1984).

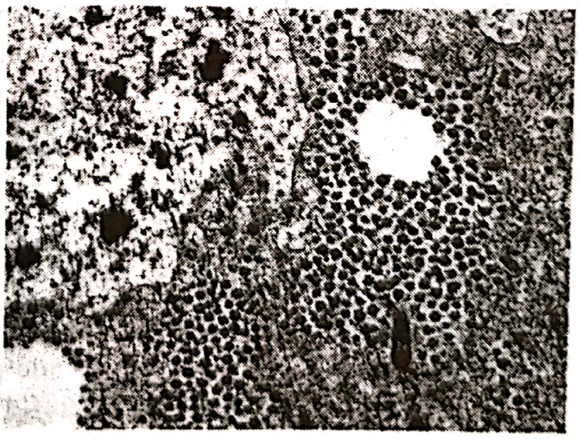


Fig. 7 — Profile de cromozomi lampbrush în nucleul ovocitei de triton. În citoplasmă se observă numeroase corpuri poliedrale, probabil particule virale aparținând unui virus neidentificat (după Gavrilă și Mihăescu, 1984).

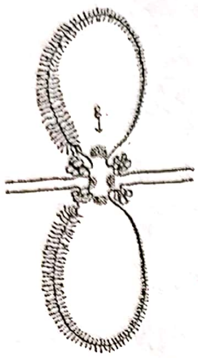


Fig. 8 — Modelul cel mai acceptat de organizare a cromozomilor lampbrush:
- structură bicromatidică;
- o cromomeră cuprinde patru regiuni asociate prin intervenția proteinelor de lipire (*glue proteins*) fără împletirea intimă a fibrelor de cromatină;
- buclele surori pot fi similare, dar nu neapărat identice în dimensiuni și în direcția de polarizare a grosimii (după Macgregor, 1993).

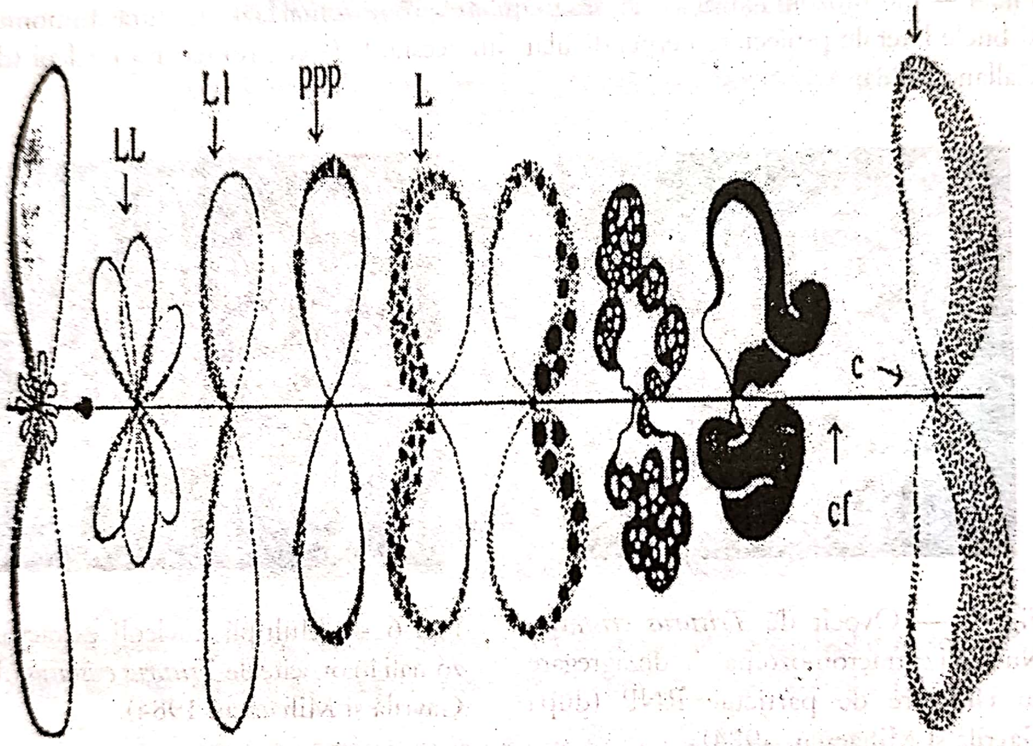


Fig. 9 — O regiune dintr-un cromozom lampbrush ce prezintă următoarele trăsături:
(1) Fibre axiale intercromomerice (cf) ce conectează cromomere mici, compacte.
(2) Cromomere care dau naștere la o singură pereche de bucle (I.) sau la perechi multiple de bucle (I.I.).
(3) Bucle cu diferite morfologii.
(4) Bucle surori de diferite lungimi (I,I).
(5) Cromomere fără bucle.
(6) Asimetrie în grosimea buclelor (P).
(7) Bucle ce conțin o singură unitate de polarizare (P).
(8) Bucle ce conțin mai multe unități de polarizare dispuse în tandem (ppp). (după Macgregor, 1993).

Buclele pornesc de la nivelul cromomerelor omoloage, dintr-un punct al acestor cromomere, prezentându-se ca un filament subțire, care se îngroașă progresiv pe măsură ce bucla revine în cromomeră, într-un punct de intrare, adiacent celui de ieșire. Există, așadar, un gradient de grosime al buclelor laterale.

Buclele reprezintă porțiuni despiralizate ale fibrei de cromatină la nivelul cărora ADN-ul este activ transcris. Gradientul de grosime al buclei este interpretat în termenii unei sinteze de molecule de ARN cu lungime progresiv crescută, pornind de la punctul de inițiere a transcrierii, ce corespunde porțiunii subțiri a buclei laterale unde moleculele de ARN sunt de lungimi finale.(vezi fig. 4)

Buclele pot conține o singură unitate transcripțională, sau mai multe unități, prezentând variații în aranjamentul acestora, în funcție de gardientul de grosime (fig. 10).

La *Triturus*, se apreciază a fi circa 20.000 de bucle laterale.

Buclele reprezintă modificări reversibile ale structurii cromozomale la nivelul unor gene active, ele reducându-se sau chiar dispărând, atunci când se acționează cu inhibitori ai transcrierii genice.

Buclele laterale apar din cromomere. Uneori cromomerele, în loc de bucle, prezintă noduli sau knobi (structuri sferice), câte unul pe fiecare omolog.

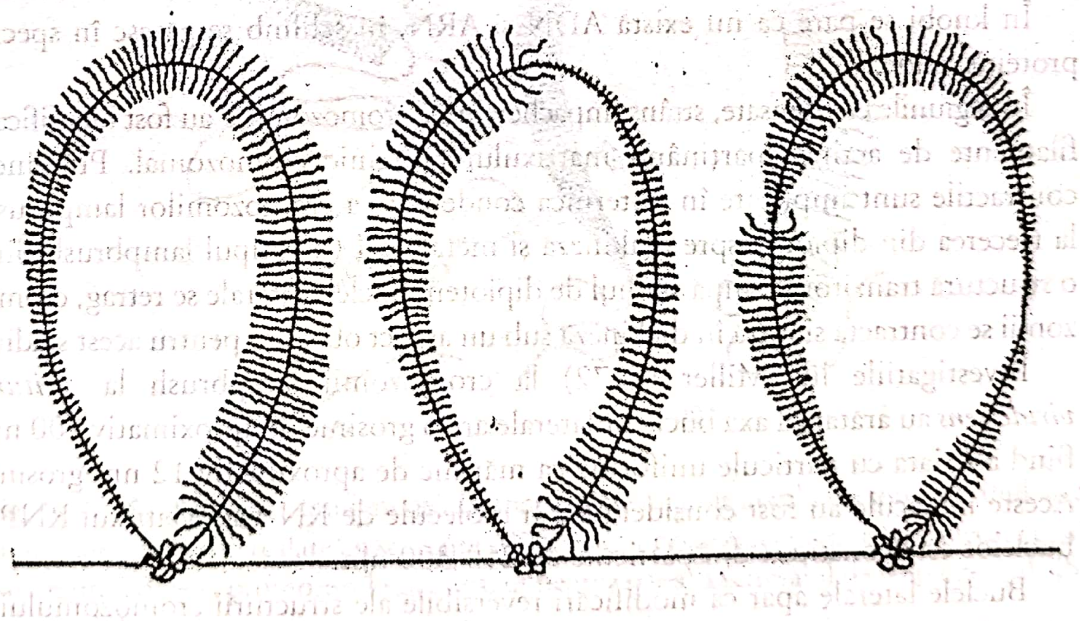


Fig. 10 — Variații în aranjamentul unităților de transcriere întâlnite în cromozomii lampbrush. În stânga este reprezentată o buclă ce conține o singură unitate transcripțională. În mijloc este o buclă ce conține două unități transcripționale de aceeași dimensiune și aceeași polaritate. În dreapta este reprezentată o buclă cu trei unități transcripționale de diferite mărimi și cu polaritate diferită (după Macgregor, 1993).

Chiasmele se găsesc întotdeauna în axa cromozomului, niciodată în bucle.

Pe cromozomii „perie de lampă“ pot fi recunoscuți organizatorii nucleolari, având uneori atașați nucleoli.

Centromerii se deosebesc de cromomere deoarece sunt întotdeauna lipsiți de bucle.

Telomerele sunt structuri distincte, formate dintr-o granulă ce conține ADN, înconjurată de un corp sferic ce conține proteine.

Structura chimică a cromozomului „perie de lampă“, cel mai bine s-a studiat prin digestie enzimatică cu ajutorul DN-azei I, ribonucleazei și a enzimelor proteolitice.

Fiecare cromozom reprezintă o pereche de fibre deoxiribonucleoproteinice (fibre nucleozomale formate din ADN și histone, câte una pentru fiecare cromatidă).

Axa cromozomului este bicromatidică, iar buclele conțin o singură cromatidă. Axa fiecărei cromatide este un dublu helix ADN.

ARN, absent în axa cromozomului și în cromomere, este prezent în cantități mari în matricea buclelor. Proteinele reprezintă o parte importantă din masa cromozomilor.

Histonele sunt prezente în cantități mari în cromomere, iar nonhistonele sunt importante în menținerea structurii atât a cromomerelor cât și a buclelor laterale.

În knobi se pare că nu există ADN și ARN, în schimb se găsesc în special proteine acide.

În regiunile condensate, strâns împachetate ale cromozomilor au fost identificate filamente de actină aparținând matrixului proteinic cromozomal. Proteinele contractile sunt implicate în puternica condensare a cromozomilor lampbrush, la trecerea din diploten spre diakineză și metafaza I (fenotipul lampbrush fiind o structură tranzitorie, după stadiul de diploten, buclele laterale se retrag, cromozomii se contractă și intră în diakineză sub un aspect obișnuit pentru acest stadiu).

Investigațiile lui Miller (1972) la cromozomii lampbrush la *Triturus viridescens* au arătat că axa buclelor laterale are o grosime de aproximativ 100 nm, fiind asociată cu particule uniforme ca mărime de aproximativ 12 nm grosime. Aceste molecule au fost considerate a fi molecule de RN-ază. Matrixul RNP al buclelor este constituit din particule de 250-300 nm.

Buclele laterale apar ca modificări reversibile ale structurii cromozomului la nivelul unor gene active. Ele sunt unități funcționale de activitate genică.

Au fost descrise între 3000 și 6000 de astfel de bucle per genom haploid. La unele Urodele, de la nivelul unor bucle, sunt eliberate continuu structuri circulare. Aceste structuri conțin ADN și prezintă nucleoli extracromozomali ce rezultă în urma procesului de extrareplicare (amplificare genică ribozomală).

7. ORGANIZAREA FUNCȚIONALĂ A CROMOZOMILOR LAMPBRUSH

Buclele laterale ale cromozomilor lampbrush reprezintă un substrat de intensă activitate genică, segmentele din ADN cromozomal corespunzător buclelor laterale funcționând ca matriță pentru sinteza ARN.

Bucla laterală este considerată unitate de transcriere.

ARN este transcris numai din o mică parte a ADN cromozomal, porțiune comparabilă cu cantitatea de ADN găsită în buclele laterale. Lungimea moleculelor de ARN este comparabilă cu lungumea buclelor laterale și deci, cantitatea de ADN cromozomal transcris este comparabilă cu cantitatea de ADN din buclele laterale.

Buclele reprezintă modificări reversibile ale structurii cromozomale la nivelul unor gene active, ele reducându-se sau chiar dispărând, atunci când se acționează cu inhibitori ai transcrierii genice.

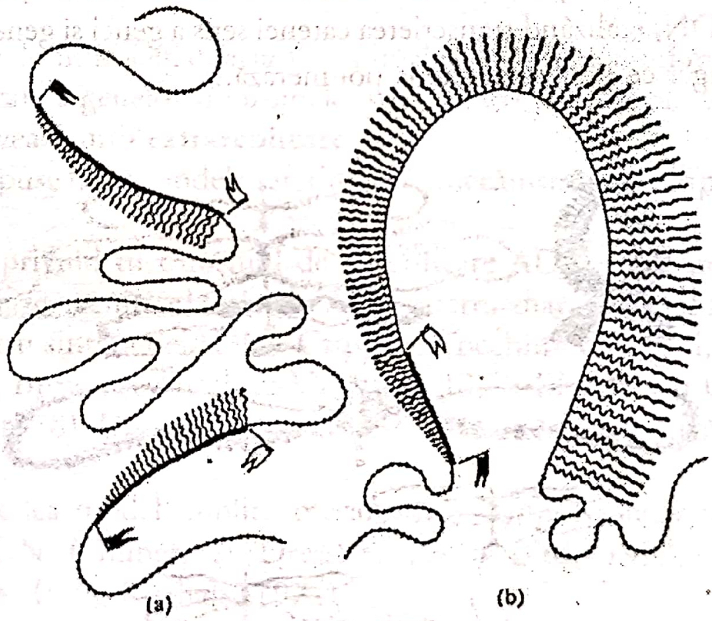


Fig. 11 — (A) Descrierea unui model de transcripție întâlnit în celulele somatice diploide, unde genele sunt intercalate cu secvențe ADN spacer ce rămâne netranscris. Fiecare genă este transcrisă de la promotorul său (steagul negru) până la semnalul de stop (steagul alb) și nu mai departe.
(B) Descrierea situației de la nivelul buclelor lampbrush unde gena este transcrisă de la promotorul său împreună cu secvențele de ADN spacer, generând astfel unități transcripționale cu transcripte lungi ce includ ADN complementar cu secvența de ADN corespunzătoare genei (regiunea îngroșată a transcriptelor) și ARN complementar cu ADN nonsens (ADN spacer) (regiunea mai puțin îngroșată a transcriptelor). (după Macgregor, 1993).

Buclele laterale sunt asociate deci, cu un matrix RNP . La *Triturus*, se apreciază a fi circa 20.000 de bucle laterale.

Porțiunile axiale și cromomerele cromozomilor lampbrush nu sunt active în transcriere, fapt demonstrat autoradiografic (lipsa incorporării uridinei tritiate la nivelul acestor segmente) și imunochimic (anticorpii pentru ARN-polimerază se leagă doar la buclele laterale, nu însă și la axă sau cromomere). Deci buclele lampbrush sunt unități de activitate genică.

Transcrierea începe de la una din inserțiile sale în cromomeră și continuă progresiv spre celaltă inserție, astfel că bucla apare cu o asimetrie în grosime, aceasta crescând progresiv, de la un capăt la celălalt al buclei.

Regiunea mai subțire a fiecărei bucle (ce reprezintă startul unității transcripționale) conține situsul promotor — un semnal de start pentru funcționarea secvenței genice.

Moleculele de ARN-polimerază se atașează la acest situs și apoi se deplasează de-a lungul ADN, realizând transcrierea catenei sens a genei și generând molecule de ARN mesager ce rămân atașate la polimerază.

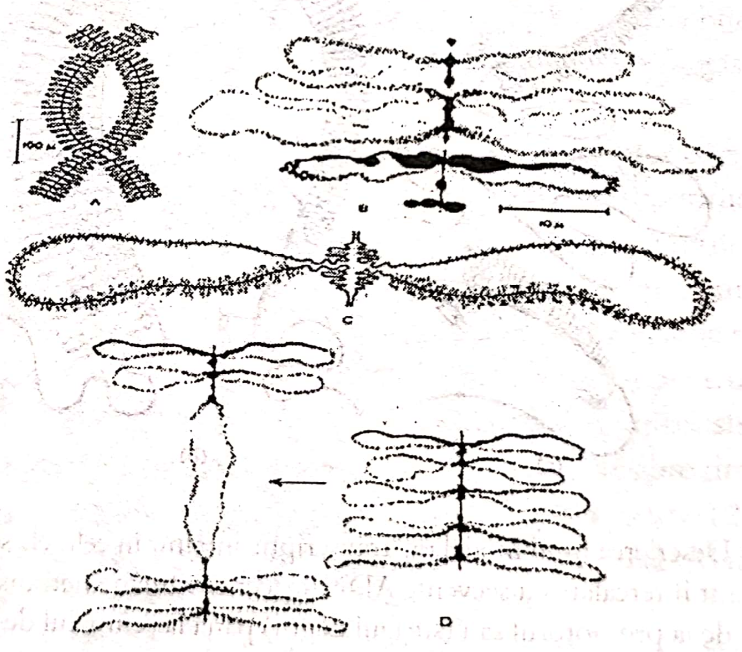


Fig. 12 —(A) Reprezentarea schematică a unui bivalent lampbrush cu două chiasme și numeroase perechi de bucle.
(B) Câteva tipuri de perechi de bucle într-un cromozom lampbrush.
(C) Reprezentarea structurii unei cromomere și a unei perechi de bucle atașată la ea.
(D) Experimentul de întindere (*stretching experiment*) al lui Callan (după Gall, 1956).

În cazul buclelor lampbrush, nu există un semnal stop definitiv pentru transcriere, deci polimeraza continuă să transcrie peste semnalul de stop (capătul funcțional al genei).

Consecința este prezența unor transcripte foarte lungi, ce conțin în molecula lor atât ARN complementar secvenței genice cât și ARN complementar ADN spacer (fig. 12).

Există bucle ce conțin o singură unitate transcripțională și bucle ce conțin mai multe unități transcripționale.

Cromozomii lampbrush sunt implicați în sinteze bogate de acizi nucleici, în celulele în care apar acești cromozomi având loc fenomenul de **amplificare genică,** în special a genelor ribozomale.

8. MECANISMUL MOLECULAR AL AMPLIFICĂRII ADNr LA NIVELUL BUCLELOR LAMPBRUSH

În ovocitele de amfibieni ca și la alte animale s-a evidențiat cel mai caracteristic caz de amplificare a genelor ribozomale. În acest caz, amplificarea genelor ribozomale se realizează prin **extrareplicare**.

Au fost propuse două modele referitoare la mecanismul de amplificare genică meiotică.

Un model privind mecanismul de amplificare ADN_r ar fi implicarea unei reverstranscriptaze, rezultând astfel un ARN intermediar, care este folosit ulterior ca matriță pentru sinteza de ADN_r (Crippa și Tocchini-Valentini, 1971; Ficq și Brachet, 1971; Brown și Tocchini-Valentini, 1972; Mahdavi și Crippa, 1972, citați de Nagl, 1978). Din păcate, nu au fost detectate matrița ARN sau hibridul intermediar.

Cel de-al doilea model implică mecanismul inelului rotativ în procesul de amplificare ADN (Gillbert și Dressler, 1969; Bird, 1973, Kasamatsu și Vinograd, 1973, 1974; Rochaix, 1974).

Actualmente tehnicile autoradiografice au confirmat implicarea mecanismului inelului rotativ în amplificarea ADN_r în ovocite. În plus, s-a sugerat o combinație între cele două modele (Tocchini-Valentini ,1974). Conform acestei teorii, unitățile replicative de ADN, denumite *ampliconi*, sunt mai întâi transcrise de la un ARN 45S. Ulterior, acest ARN este revers-transcris în produși monomerici ce sunt uniți cap la cap și apoi circularizați. Această structură este apoi replicată prin modelul inelului rotativ, pentru a da produsul final.

În stadiul timpuriu al ovogenezei amfibienilor are loc o multiplicare selectivă a genelor pentru ARNr. Procesul este cunoscut în general sub denumirea de **amplificare genică ribozomală**.

Creșterea sintezei de ARN în sistemul lampbrush se bazează pe mărirea numărului de matrițe ADN.

În nucleii ovocitelor cu cromzomi lampbrush se află un număr imens de **nucleoli** (1.000, la *Triturus*, 600-1.200, la *Xenopus*) reprezentând rezultatul amplificării genice a regiunilor organizator nucleolare care, prin extrareplicare după modelul inelului rotativ, se desprind de la nivelul cistronilor pentru ARNr, rămânând în nucleu și continuând să se replice ca axe nucleolare circulare extracromozomale de ADNr care, funcționând ca matriță pentru sinteza ARNr, se înconjoară de molecule ARNr devenind nucleoli extracromozomali, care pot ieși, uneori ca atare, din nucleu în citoplasma ovocitului.

Consecința citologică a amplificării genelor ribozomale în ovocitele de amfibian este adoptarea unei stări multinucleolare în care, fiecare din numeroșii nucleoli este un corpuscul independent, liber fizic de replica sa activă sintetic (organizatorul nucleolar cromozomal).

La *Xenopus laevis*, ADNr din nucleol formează frecvent o masă compactă de 20-30 pg ADN, ce ocupă mai mult de jumătate din nucleu în stadiul de pachiten. În diplotenul timpuriu, acest ADN se dispersează în numeroase granule de dimensiuni mici, care au tendința de a se distribui randomizat, pe suprafața internă a anvelopei nucleare. Cea mai mare parte a sintezei de ADN, ce însoțește amplificarea genică ribozomală are loc în nucleii ce se găsesc la granița dintre pachiten și diploten.

La unele specii de amfibieni, nucleolii ovocitelor formează șiraguri de mărgele ("*beaded rings*"), iar componenta ADN a nucleolilor formează axa ce conectează acești nucleoli extracromozomali. Faptul că integritatea structurală a acestor șiraguri este menținută de către ADN a fost demonstrat prin tratamente cu deoxiribonuclează, enzime proteolitice și ribonuclează. Fibrele axiale pot fi digerate doar cu DN-ază. Lungimea acestor șiraguri variază de la 35 μm la 5mm.

Mecanismul molecular al amplificării ADN$_r$ nu este suficient înțeles însă, permite câteva speculații rezonabile. La *Xenopus laevis*, mii de inele ADN nucleolare sunt sintetizate în ovocitele aflate în pachiten în decurs de 20 de zile (Bird și Birnstiel, 1971; Watson-Coggins și Gall, 1972). Inelele sunt variabile ca lungime. Cel mai mare inel este mult mai mare decât organizatorul nucleolar cromozomal, iar cel mai mic este probabil, mult mai scurt decât acesta.

Organizatorul nucleolar cromozomal cuprinde 450 de repetiții în tandem a unei regiuni de ADN dublu catenar, care include secvența complementară cu ARNr 28S și 18S și o secvență spacer. De asemenea, ADN amplificat este dublu catenar.

Genele pentru ARNr 5S nu sunt amplificate, deoarece frecvența lor de reiterare per genom este mult mai mare decât cea pentru celelalte specii de ARNr.

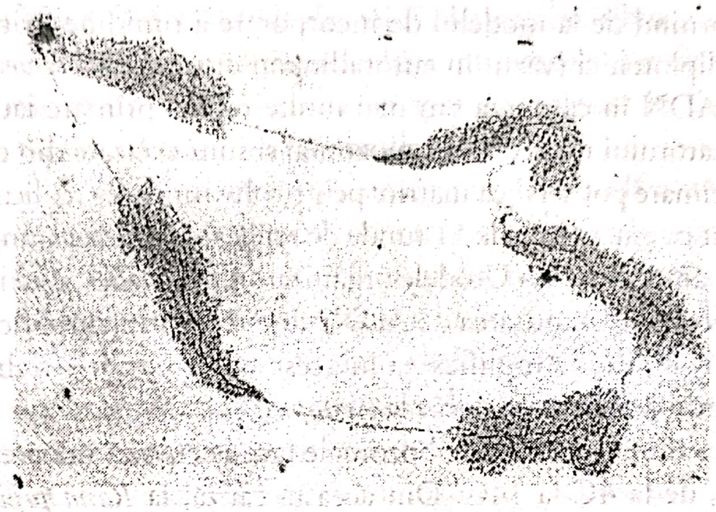


Fig. 13 — Inel de ADN nucleolar cu cinci unități repetitive ribozomale la *Dytiscus marginalis* (x 9.800) (după Scheer, 1987).

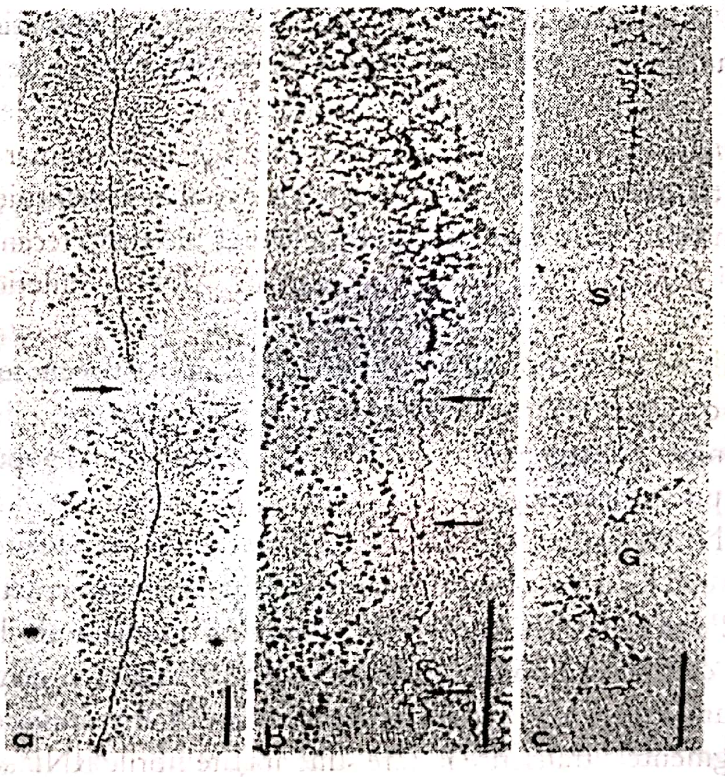


Fig. 15 — a-c Detalii de structură asupra genelor ribozomale (tehnica Miller). a) Două gene pentru ARNr așezate în tandem, în ovocitele de *Triturus cristatus*. Se observă granule ce densitate mare, reprezentate de ARN polimerază și regiunea spacer (săgeata) (x 28000); b) Detaliu al regiunii spațiatoare (săgețile) (x 70000); c) Conformația fină, nonnucleozomală a cromatinei este menținută atât la nivelul regiunii spațiatoare (S), cât și la nivelul genei (G) (x45000); bara= 0,5 µm (după Scheer, 1987).

Slender, pornind de la modelul de incorporare a timidinei tritiate în nucleii pachitenici și diplotenici (văzut în autoradiografie) sugerează o cascadă de tipuri de replicare a ADN în care una sau mai multe replici primare iau naștere de la nivelul organizatorului nucleolar cromozomal și sunt excizate din cromozom, iar aceste replici primare pot servi ca matrițe pentru alte runde de replicare. La *Xenopus laevis* s-a estimat că este nevoie de 11 runde de replicare pentru a ajunge la cantitatea finală de ADN amplificat. La Urodele organizatorul nucleolar este mult mai mare decât la *Xenopus*, totuși cantitatea de ADNr sintetizat prin amplificare, în ovocite este aproximativ aceeași. Amplificarea în acest caz la Urodele trebuie să implice mai puține runde de replicare decât la *Xenopus*.

Amplificarea numai a genelor ribozomale face să crească valoarea conținutului total de ADN, de la 4C la 14C. Din această cauză, la *Rana pipiens* și *Xenopus laevis*, cantitatea de ADN din ovocite ajunge să fie de 300-500 de ori mai mare decât cantitatea diploidă de ADN. Se adaugă la aceasta și amplifiarea meiotică a ADN mitocondrial

Rezultatul final al replicării ADN nucleolar este o populație de molecule circulare. O caracteristică pentru ADN$_r$ circular este faptul că poate exista în forme oligomere și concatenane. Formele concatenane sunt duplexuri circulare imbricate („*interlocking*"), unde fiecare cerc reprezintă un monomer circular închis.

S-a constatat că ADNr circular extracromozomal ce constituie axele nucleolilor extracromozomali este lipsit de 5-CH_3 citozină. Cercetări recente par să indice existența unei corelații între o metilare redusă a ADN și funcționarea genelor respective.

Extracopiile ADNr sunt funcționale doar în timpul ovogenezei, pe seama lor realizându-se o bogată rezervă de ribozomi.

Acest fenomen de extrareplicare a ADNr asigură zigotului o populație suficientă de ribozomi, putându-se angaja în diviziuni de segmentare.

Axele ADNr ale extranucleolilor de la *Triturus* au fost izolate după tehnica Miller și la nivelul lor a fost observată la microscopul electronic, activitatea genelor ribozomale. Pe axele ADN sunt dispuse într-un gradient de lungime fibrile reprezentând complexe ribonucleoproteice (RNP) atașate la genele ribozomale corespunzătoare. Lungimea lor diferită denotă etape diferite în sinteza moleculelor de ARNr. Segmentele transcrise la care sunt atașate fibrile RNP sunt separate de porțiuni netranscrise (ADN spacer) silențiate.

Uneori, extracopiile genelor ribozomale pot migra din nucleu în citoplasmă și continuă să funcționeze ca matrițe pentru sinteza ARN.

La *Xenopus*, amplificarea genelor ribozomale după mecanismul de mai sus face ca valoarea ADNr extracromozomal să fie de trei ori mai mare decât a ADN cromozomal, ovocitele sale conținând în acest stadiu 2.500-5.200 organizatori nucleolari, existând peste 24.000 de copii ale genelor ribozomale per genom. Extracopiile sunt asociate micronucleolilor numeroși. Aceste extracopii sunt depozitate și conservate în citoplasmă — spre a fi folosite în timpul clivării — după care, nemaifiind funcționale, sunt eliminate.

Amplificarea genică, realizată prin extrareplicarea locală a unor segmente de ADN, în care buclele laterale ale cromozomilor lampbrush reprezintă doar una dintre expresiile procesului. Existența multiplilor nucleoli extracromozomali este considerată potrivit ipotezei **master-slave** a lui H. G. Callan (1974), consecința faptului că buclele sunt alcătuite din mai multe gene de același tip numite gene „sclave“ care sunt coordonate în activitatea lor de o genă principală denumită „stăpân“, și care sunt angajate în sinteza de ARNm sau ARNr.

Se consideră că nucleolii extracromozomali reprezintă deci, rezultatul amplificării genice ribozomale si al grijii materne pe care organismul matern o manifestă chiar la nivel molecular față de progenitură, deoarece asigură pe această cale o bogată rezervă de ribozomi zigotului, astfel că, acesta, despovărat de sarcina sintezei de componente ribozomale, se angajează în desfășurarea unor diviziuni rapide de clivaj, care conduc la formarea embrionului.

9. ROLUL AMPLIFICĂRII GENICE DIN OVOGENEZĂ ÎN CURSUL ONTOGENEZEI DESCENDENȚILOR

Un exemplu interesant de diferențiere celulară îl reprezintă trecerea ovocitei spre ovulul matur. Este posibil ca la toate organismele la care există meioză, cromozomii din bivalenți să adopte între pachiten și diakineză un aspect structural lampbrush. Morfologia lampbrush apare mai ales la cromozomii din diploten, în special când acest stadiu este prelung. În ovogeneza femeii, diplotenul durează de la naștere până la eliminarea ovulelor, începând cu vârsta pubertății și un asemenea diploten prelungit s-a numit **dictioten**.

Toți cromozomii cu configurație lampbrush sunt implicați într-o intensă transcriere genetică și ARNm produs în acest proces este menținut într-o formă stabilă, în celelalte stadii ale maturării ovulului.

Când ovulul este fecundat, acest ARN sintetizat în stadiul lampbrush direcționează multe evenimente din dezvoltarea ulterioară, fapt dovedit în experimentele cu actinomicină D, inhibitor specific al transcrierii genetice, dar care nu afectează sinteza proteinică sau dezvoltarea normală a embrionului până în stadiul de blastulă (6.000-15.000 celule), celula având deja rezerve de ARN.

La *Xenopus*, în stadiul de pachiten se înregistrează un fenomen foarte interesant, de amplificare a genelor ribozomale în cadrul căruia se sintetizează peste 1.500

de copii ale acestor gene. Aceste copii formează **corpul ADN** prin a cărui dispersie rezultă 1.000-1.500 nucleoli extracromozomali angajați în sinteză intensă de ARNr. Se cunosc și cazuri în care copii ale genelor nucleare care codifică ARNr 18S și 28S din ovocite, sunt eliberate, formând mici cromozomi acentrici, reținuți în nucleu, sau sunt eliminate în citoplasmă, unde continuă să fie transcrise.

La *Dytiscus* acest corp ADNr s-a numit **corpul Giardina**. În acest caz, cromatina amplificată apare ca o masă de fibre nucleohistonice ce ies din regiunea organizator nucleolară.

Numărul de gene redundante pentru ARNr dintr-o celulă somatică obișnuită de la *Xenopus* este de 640 și se găsește la nivelul organizatorului nucleolar implicat în codificarea ARNr 18S și 28S. În ovocita de *Xenopus* însă, acest nivel de redundanță a genelor ribozomale nu este suficient pentru îndeplinirea integrală a rolului acestei celule. Ca urmare, are loc fenomenul de amplificare a genelor ribozomale care duce la un număr de peste 24.000 de copii ale genelor ARNr per genom. Această amplificare din ovocită va fi urmată, în dezvoltarea ulterioară a zigotului, de un proces de amplificare, cu revenirea la nivelul de redundanță specific celulelor somatice.

Un aspect deosebit al ovocitelor în general, și al amfibienilor în special, este prezența unei cantități mult mai mari de ADN în citoplasmă, față de conținutul de ADN nuclear. O parte din acest ADN citoplasmic se asociază cu plachetele viteline, iar funcția sa este necunoscută.

Cea mai mare parte a ADN citoplasmatic al ovocitei este de origine mitocondrială, în ovocită fiind stocate numeroase mitocondrii, ovocitele mature fiind inactive transcripțional și translațional.

Ribozomii și ARNm în ovulul nefecundat sunt cuplați cu o proteină fiind stocați în această formă rezistentă la acțiunea RN-azelor. După fecundare proteazele devin active, digeră proteina și este permisă traducerea. Tot după fecundare, este adăugată coada poli-A, la unele tipuri de ARNm matur, localizate în citoplasmă și astfel ele pot fi traduse.

Ribozomii sintetizați în timpul primei diviziuni meiotice se acumulează în ovul sub formă de ribozomi materni care vor reprezenta ribozomii funcționali în zigot. O situație similară se înregistrează și la pești.

Genomul zigotului care cuprinde informația ereditară atât de origine maternă, cât și de origine paternă, începe să transcrie și treptat, predomină asupra informației materne, depozitată în ovul. Totodată are loc și așa numita **determinare primară** care direcționează celulele spre anumite specializări (ectoderm, endoderm, mezoderm). Odată realizată determinarea primară, descendenții unei astfel de celule sunt supuși unor mecanisme mult mai fine de determinare care vor duce la o evoluție spre linii strict specializarte cum ar fi linia hepatică, linia celulară, sau linia musculară etc.

10. ARHITECTURA MATERIALULUI GENETIC ÎN SPERMATOGENEZĂ

Celulele germinale mascule nu se dezvoltă izolat în cursul spermatogenezei. Întotdeauna ele cresc și se diferențiază sub forma unor clone sincrone, de celule conectate prin punți intercelulare, deci prezintă un aranjament sincițial. Acest comportament este datorat faptului că, celulele germinale mascule suferă o citokineză incompletă în toate celulele fiice rezultate dintr-o spermatogonie, rămânând conectate prin punți citoplasmatice.

Aceste punți persistă până în momentul când spermatozoizii sunt eliberați în lumenul tubului seminifer.

Spre deosebire de ovocit, în cursul spermatogenezei majoritatea diferențierilor citoplasmatice se produc atunci când nucleii celulelor germinale au suferit mitoza și meioza, devenind haploizi. Aceste punți citoplasmatice ar permite fiecărei celule germinale haploide să se dezvolte, să fie aprovizionată cu toți produșii unui genom diploid (Fig 16 a, b).

Există două argumente care susțin imporatnța genomului diploid în diferențierea spermatozoidului:

– Genomul haploid din care provine nucleul spermatozoizilor conține și unele copii genice anormale ce corespund mutațiilor recesive letale. Un spermatozoid ce ar moșteni o astfel de copie genică anormală, ar fi sortit morții dacă el nu ar fi aprovizionat cu produsul normal al genei, codificat de alt nucleu.

– La majoritatea organismelor, inclusiv la om, unii spermatozoizi moștenesc cromozomul X, în timp ce alții moștenesc cromozomul Y. Deoarece pe cromozomul X se găsesc foarte multe gene esențiale pentru diferențierea spermatozoizilor, este foarte puțin probabil ca spermatozoizii purtători de cromozom Y să se diferențieze și să se matureze în absența produșilor cromozomilor X. Și pe cromozomul Y există gene care controlează spermatogeneza — cum ar fi gena **azf** (“azoospermia factor“), așa cum reiese din studiile efectuate pe bărbați sterili. În prezent, la om se studiază două gene candidate pentru locusul **azf** — **YRRM1** și **YRRM2** care se consideră a fi cruciale pentru o spermatogeneză normală (Cârlan, 1996).

Deci, diferențierea spermatozoizilor este guvernată de produșii genomului diploid.

Cea mai importantă dovadă experimentală a fost găsită la *Drosophila*, la care s-a demonstrat existența unei mutații în care are loc o disjuncție cromozomală

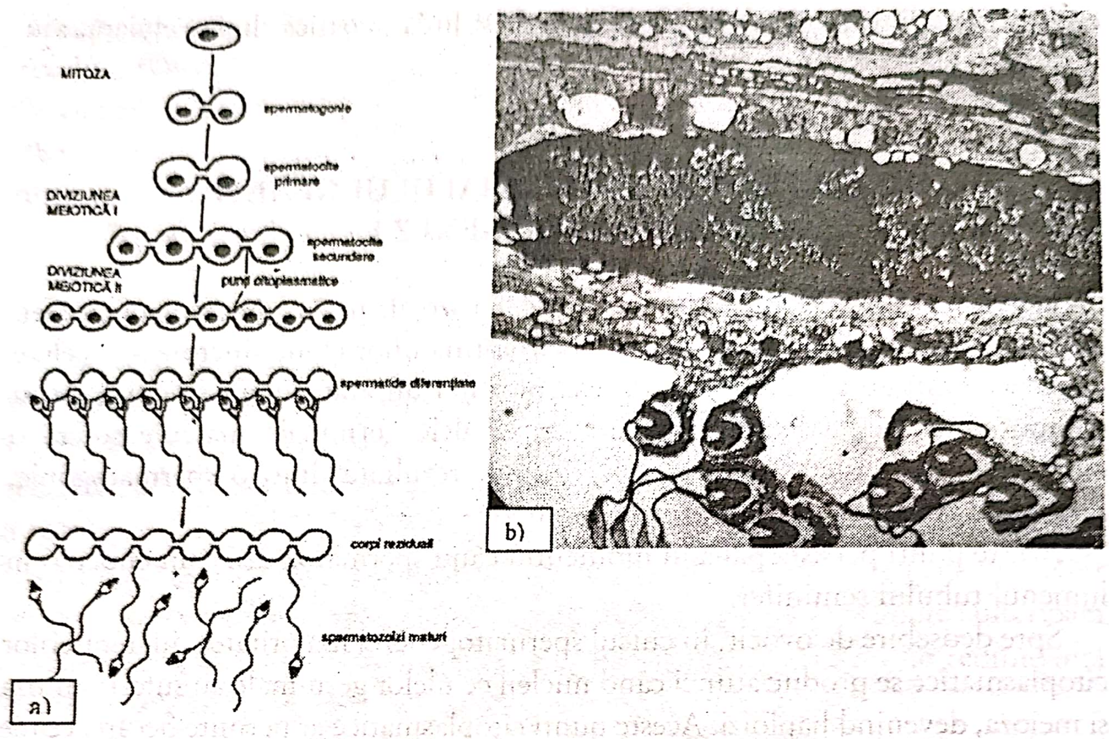

MITOZA
spermatogonie
spermatocite primare
DIVIZIUNEA MEIOTICĂ I
spermatocite secundare
DIVIZIUNEA MEIOTICĂ II
punți citoplasmatice
spermatide diferențiate
corpi reziduali
spermatozoizi maturi
a)
b)

Fig. 16 — a) Aranjamentul sincițial al celulelor germinale mascule în spermatogeneză (după Alberts și colaboratorii, 1994); b) Imaginea electronomicroscopică a unei celule Sertoli de care sunt atașate, prin punți citoplasmatice, spermatide (x 23 214) (Gavrilă și Mircea, 2001).

anormală, astfel încât, cromozomii sunt distribuiți inegal între celulele fiice. În urma acestui proces, unele celule prezintă prea mulți cromozomi, altele prea puțini, iar altele deloc. Diferențierea spermatozoizilor are loc în toate celulele, inclusiv în cele fără cromozomi.

Au fost elaborate două explicații pentru acest fenomen:

- fie produșii cromozomilor lipsă difuzează prin punțile citoplasmatice astfel încât, toate celulele sunt aprovizionate cu produșii necesari pentru realizarea diferențierii spermatozoizilor.

- fie spermatogoniile și spermatocitele primare diploide produc înaintea meiozei molecule stabile (probabil ARNm), care sunt folosite ulterior pentru diferențierea spermatozoizilor.

Nucleul haploid al spermatozoidului nu funcționează în perioada diferențierii citoplasmatice.

Deși diferențierea spermatozoidului are loc atunci când nucleul acestuia este haploid, ea implică produșii ambelor seturi de cromozomi.

11. ORGANIZAREA ADN ÎN NUCLEII SPERMATOZOIZILOR

În nucleii spermatozoizilor, ADN este organizat într-o altă conformație tridimensională, datorită înlocuirii histonelor de către o clasă deosebită de proteine nucleare — **protamine**. Această formă particulară de organizare conferită de protamine determină inactivitatea ADN din spermatozoizi (nu există transcriere genică și nu există replicare) și conferă omogenitate structurală (nu există cromatină activă, toată cromatina din nucleii spermatozoizilor fiind inactivă). În timpul stadiilor timpurii ale spermatogenezei, nucleii sunt activi din punct de vedere genetic, inactivarea având loc în stadiul de spermatidă, când are loc înlocuirea histonelor și hipermetilarea ADN.

12. FENOTIP CROMOZOMAL LAMPBRUSH A CROMOZOMUL Y DIN SPERMATOCITELE PRIMARE DE LA *DROSOPHILA HYDEI*

Un exemplu elocvent al activității genice din spermatocite îl constituie aspectul lampbrush pe care îl adoptă cromozomul Y din spermatocitele primare de la *Drosophila hydei*. Acesta apare ca un cromozom univalent care prezintă cinci bucle foarte mari, diferențiate morfologic (fig. 17, 18).

Aceste bucle sunt active în sinteza ARN implicat în producerea de proteine necesare în spermatogeneză. Sinteza de ARN la nivelul buclelor lampbrush a fost evidențiată prin tratament cu uridină tritiată și ulterior, analizat autoradiografic (Hennig,1967; Grond et al. 1984). Este posibil ca existența cromozomului Y cu aspect de cromozom lampbrush în meioza desfășurată în cadrul spermatogenezei la această specie să fie legată de producerea de spermatozoizi de dimensiuni neobișnuit de mari, întâlniți doar la această specie dintre cele ale genului *Drosophila*. După 120 de ore de activitate intensă și de manifestare a morfologiei de tip lampbrush, spre sfârșitul profazei I, buclele laterale ale acestui cromozom Y (care prezintă unii markeri specifici precum porțiuni măciucate, noduri, regiuni tubulare, pseudonucleoli, porțiuni difuze) se retrag și se condensează împreună cu tot cromozomul.

Cromozomul Y de la *Drosophila hydei* conține 9,5% din întregul ADN genomic (aproximativ 40.000 Kb) (Zacharias et al 1982).

La nivelul buclelor cromozomului Y din spermatocitele primare, investigațiile imunologice au relevat prezența a mai multor tipuri de proteine: proteine ce se asociază în particule RNP, proteine bazice, specifice buclelor și proteine importante în procesul de substituție a proteinelor cromozomale în cursul procesului de spermatogeneză (Hulsebos și colaboratorii, 1982, Kremer și colaboratorii, 1986).

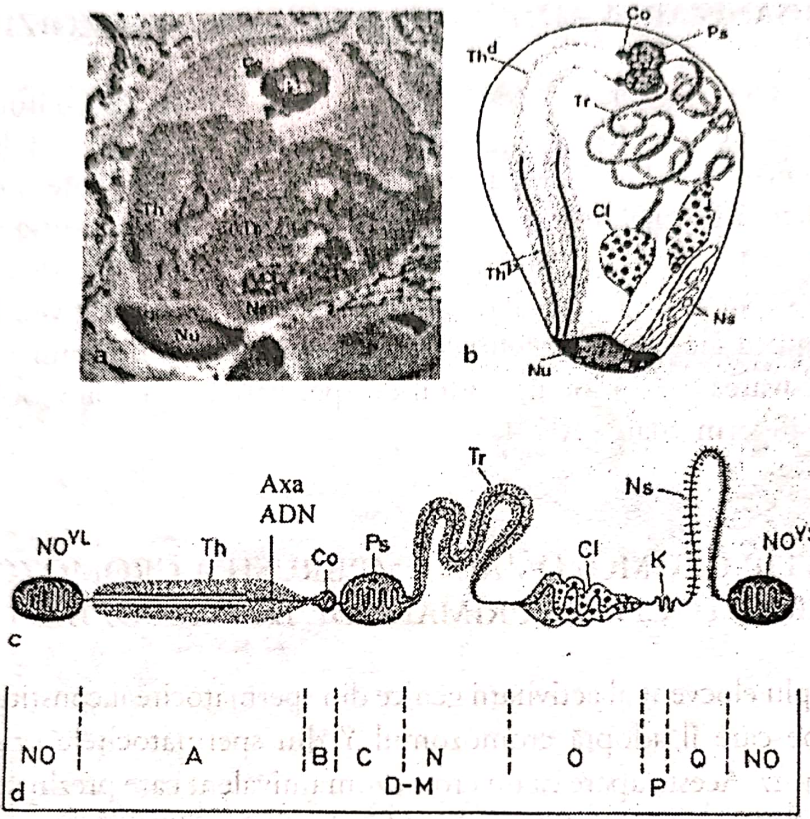


Fig. 16 — Nucleul spermatocitelor primare la *Drosophila hydei* (după Hackstein și colab., 1982)

a. În contrast de faza – un nucleu de tip sălbatic. Tot materialul vizibil din nucleu (N) cu excepția nucleolului (Nu), aparține buclelor cromozomale lampbrush. Autozomii și cromozomii X nu sunt vizibili.

b. Explicație schematică a primului desen

Sunt indicate relațiile structurale dintre bucle. Din momentul în care buclele se formează în timpul profazei meiotice, ele sunt prezente în dublu exemplar deoarece cromozomul Y conține două cromatide.

c. Schema unei cromatide. Centromerul (K) împarte cromozomul Y în două brațe unul lung (la stânga) și unul scurt (la dreapta). Brațul lung poartă cinci situsuri de formare a buclelor, iar cel mic numai unul.

Notă: conul (Co) a fost recent identificat ca o unitate transcripțională independentă, care este cel mai sigur înrudită cu grupul de complementație B.

d. Localizarea grupurilor de complementație și relațiile lor cu buclele lampbrush. Numai locurile A-C, N, O, Q sunt în relație cu situsurile de formare a buclelor. Restul grupurilor de complementație se indică mai jos, cu localizare aproximativ în relație cu buclele.

Cl= ciomag, Co= con, No= RON, Ns= nod, Nu= nucleol, Ps= pseudo nucleol, Th= fibre, Tr= regiune tubulară, A-Q= grupe de complementație, YL= braț lung, YS= braț scurt al cromozomului Y.

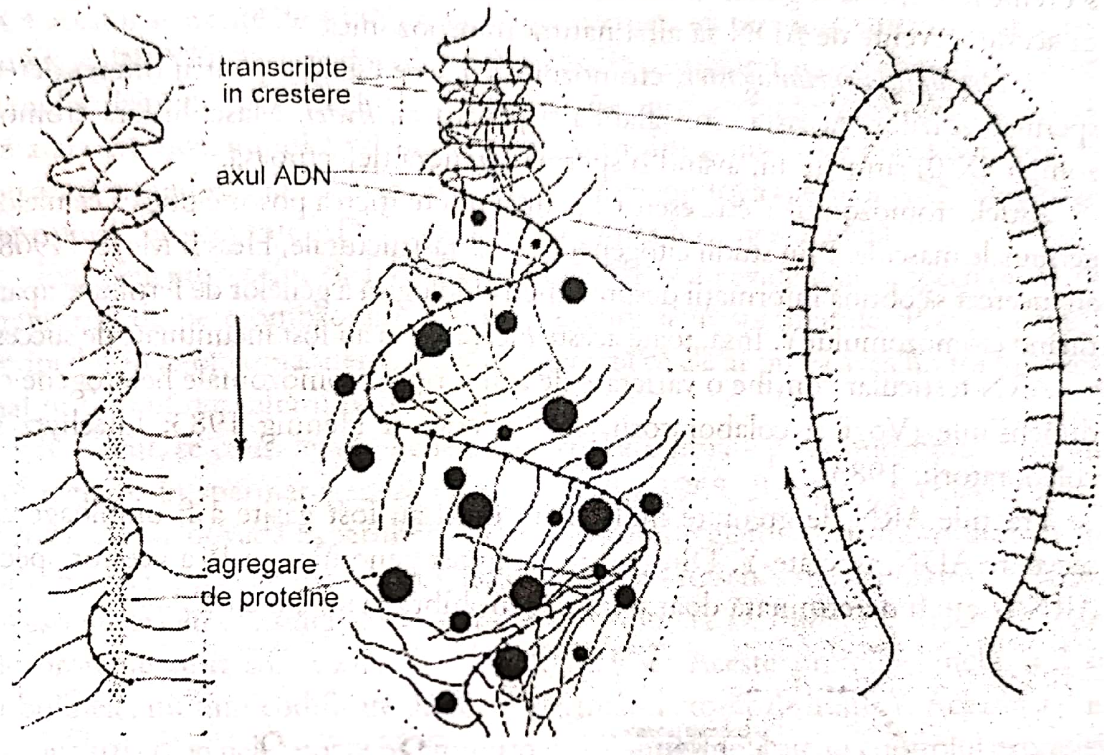


Fig. 17 — Schema compoziției și a formei a 3 tipuri de bucle lampbrush la *Drosophila hydei*:
– stânga Th – fibre
– în centru ciomag
– în dreapta nod
Direcția de transcripție este indicată prin săgeți. Modelul este bazat pe informațiile date de studiile citologice și pe experimentele cu uridina tritiata, experimente de hibridizare in situ, analize ultrastructurale. (după W. Henning, 1987)

Fiind situsuri active transcripțional, buclele lampbrush ale cromozomului Y conțin și ARN, dar într-o cantitate mai mică, comparativ cu cantitatea mare proteine. La nivel ultrastructural, ARN a fost identificat în componente „*RNP-particle-like*“,situate la nivelul buclelor (Grond și colaboratorii,1984). Buclele sunt transcrise pe întreaga lor lungime în transcripte primare uriașe. Lungimea acestor transcripte variază între 260 Kb, (în buclele cele mai mici) și 1500 Kb, în altele.

Fiecare buclă este compusă dintr-o familie de secvențe repetitive de ADN dispuse în clustere repetate în tandem, distribuite pe toată bucla. Aceste clustere rezultă din amplificarea secvenței originale de ADN de câteva sute de perechi de nucleotide, în timpul evoluției. Între aceste clustere repetate în tandem sunt inserate secvențe repetitive de ADN, cu o frecvența scăzută de repetare, dar de o complexitate ridicată (mai mult de câteva Kb în lungime) — ADN asociat-Y. Aceste secvențe intersperse se găsesc în variate locuri în afara cromozomului Y. Este posibil ca aceste secvențe de ADN să aibă natura transpozonică.

La *Drosophila melanogaster*, cromozomul Y este esențial pentru diferențierea spermatozoizilor. Aceasta este valabila și pentru *D. hydei*. Masculii fără cromozomi Y (X/0) sunt sterili, având o spermatogeneză defectuoasă.

Astfel, cromozomul Y este esențial pentru diferențierea postmeiotică a celulelor germinale mascule. Prin studii citogenetice și ultrastructurale, Hess și Meyer (1968) au încercat să obțină informații despre funcția biologică a genelor de fertilitate aparținând cromozomului Y. Însă, toate aceste încercări nu au fost încununate de succes.

ARN testicular conține o varietate de transcripte cromozomale heterogene ca dimensiune (Vogt și colaboratorii, 1982; Vogt și Hennig 1983; Litschytz și colaboratorii, 1983).

Fracțiile ARN de greutate moleculară mică au fost găsite a fi omoloage cu secvențe ADN asociate-Y. Din păcate, originea genomică reală a acestor specii ARN poate fi determinată doar parțial, prin hibridizare „in situ".

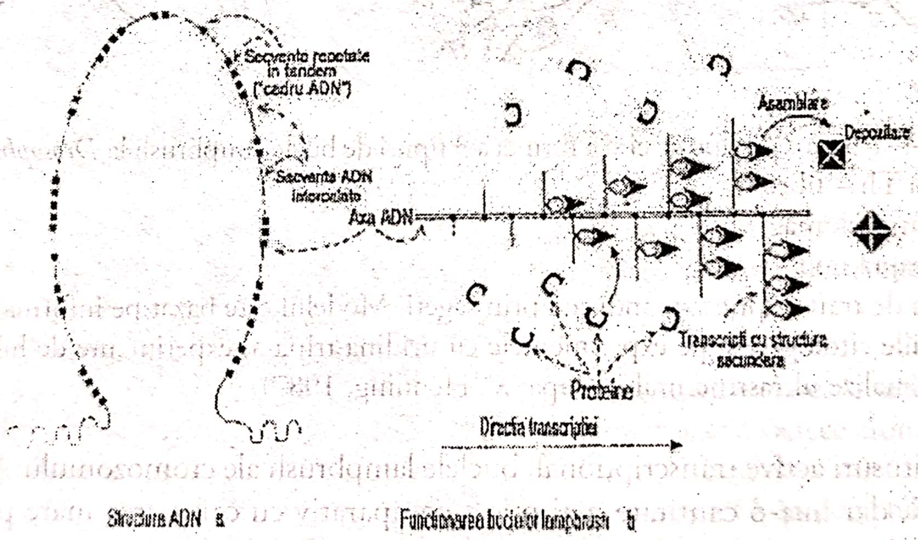

Secvente repetate în tandem ("cadru ADN")
Secventa ADN intercalata
Axa ADN
Asamblare
Depozitare
Transcripti cu structura secundara
Proteine
Directia transcriptiei
Structura ADN a
Functionarea buclelor lampbrush b

Fig. 18 — Reprezentarea schematică a structurii moleculare a buclelor lampbrush din cromozomul Y, precum și a funcției lor:

a) Bucla ADN este alcătuită din aglomerări de repetiții în tandem (tip Y specific) și alte secvențe ADN repetitive, plasate între aceste aglomerări. Aceste secvențe ADN sunt numai parțial omoloage unele cu altelem dar sunt de asemenea omoloage cu secvențele ADN externe cromozomului Y (Y asociat).

b) Transcriptele sunt selectate pe baza structurii lor secundare, proteinele nucleare fiind depozitate în interiorul buclelor. (după W. Henning, 1987).

În unele cazuri, transcripte omoloage cu secvențele ADN *„Y-associated"* au fost găsite în testiculele X/0, sugerând astfel, o transcriere autozomală sau heterozomală X a acestor secvențe de ADN; însă, în alte cazuri, aceste transcripte sunt absente în testiculele X/0. Aceasta dovedește că nu există o origine Y cromozomală exclusivă a moleculelor de ARN de dimensiuni mici, în timp ce transcrierea acestora, aflate în afara cromozomului Y (deci în alte situsuri din genom), ar putea depinde de prezența cromozomului Y în genom. Originea genomică a speciilor ARN omoloage cu tipurile de secvențe ADN asociate-Y a rămas încă neelucidată.

Experimente recente de hibridizare ADN/ARN au evidențiat că specii de ARN transcrise de pe cromozomul Y sunt prezente și în spermatide. Prezența transcriptelor în citoplasma spermatidelor sugerează că ele ar putea avea un rol funcțional în timpul dezvoltării postmeiotice.

În trecut, se considera că genele de fertilitate situate pe cromozomul Y au un rol reglator în spermatogeneză (Hess și Meyer 1968; Beerman și colaboratorii, 1967). Prima dovadă experimentală pentru rolul reglator al cromozomului Y în procesele de spermatogeneză a fost adusă de către Hulsebos și colaboratorii (1983). Acești autori au constatat că în testiculele X/0 de la *D. hydei*, trei fracții majore de proteine sunt sintetizate în cantități reduse. Aceste proteine, incluzând și tubulinele, nu sunt codificate de gene aparținând cromozomului Y. Aceasta a dus la concluzia că genele situate pe cromozomul Y sunt implicate în controlul expresiei acestor proteine. Studii moleculare recente au demonstrat că acest control ar trebui să se exercite la nivel translațional deoarece testiculele X/0 posedă cantități normale de ARNm pentru tubulină (Brand și colaboratorii).

La *D. melanogaster* s-a observat prezența unor loci *„stellati"* pe cromozomul X (Hardy și colab.1984, Livak, 1984). Acești loci codifică pentru o proteină cu M = 17.000 Da, dar secvențe omoloage au fost găsite și pe cromozomul Y. Aceste copii genice situate pe cromozomul Y sunt localizate între locii de fertilitate K12 și K13 (Hardy și colab.,1984). Atunci când cromozomul Y lipsește, se sintetizează cantități excesive de proteină cu M = 17.000 Da, care conduce la formarea cristalelor tipice pentru testiculele X/0, la *D. melanogaster* (Meyer și colab., 1961). Astfel, cromozomul Y realizează un control asupra proteinelor testiculare codificate de gene situate pe alți cromozomi din genom , dar într-un sens opus fața de *D. hydei*, supresând expresia genelor situate pe cromozomul X.

Astfel, cromozomul Y, deși inactiv și heterocromatic în celulele somatice, este activ și indispensabil pentru fertilitatea masculilor. Genele pentru fertilitate se găsesc în bucle și au rol reglator.

13. CONDENSAREA ADN ÎN NUCLEII SPERMATOZOIZILOR

Înlocuirea histonelor cu protamine are loc în spermiogeneză și este responsabilă de împachetarea ADN-ului spermatozoidului, ADN care este de 6 ori mai condensat decât în cromozomii metafazici.

Înlocuirea histonelor cu protamine are loc în două etape:

1. Histonele bogate în lizină sunt înlocuite cu histone bogate în arginină.
2. Histonele bogate în arginină sunt înlocuite cu protamine.

Un alt aspect este acela că absența completă sau aproape completă a superspiralizării ADN în nucleii spermatozoizilor corespunde cu inactivitatea cromatinei acestora. Nedesfășurâmdu-se procesele de replicare și transcriere, nu este necesară superhelicitatea negativă conferită de histone.

În comparație cu modelul nucleosomal de legare a histonelor, modelul de legare a protaminelor situate în șanțurile minore ale dublului helix de ADN, asigură o căptușire aproape completă a ADN, cu foarte puține zone libere. În felul acesta, protaminele nu au efectul de poziționare pe care îl au histonele.

De aceea, față de nucleii celulelor somatice, în nucleii spermatozoizilor se pierde structura nucleosomică și superhelicitatea negativă, câștigându-se o altă organizare specifică.

Nivelele de organizare ADN în nucleii spermatozoizilor cuprind: dublul helix ADN, complexul ADN-protamine sub forma toroidală, echivalentul solenoidic și domeniile buclate.

1. Dublul helix ADN este aproape identic cu cel al ADN din celulele somatice, dar se remarcă două diferențe: lungimea mai mare a secvențelor telomerice și extinderea hipermetilării ADN.
2. Complexul ADN-protamine este omolog cu fibra nucleosomală din nucleii celulelor somatice.

Unitatea fundamentală de împachetare a ADN legat cu protamine nu este nucleosomul, ci un toroid cu diametrul de 90 nm conținând aproximativ 60 Kb. Această structură, care diferă complet de orice structură cromatinică din nucleii celulelor somatice, a fost descrisă de Hud și colaboratorii (1993). (fig. 20)

Deoarece spermatidele și spermatozoizii nu își replică ADN după cum nici nu și-l transcriu, nu este necesar ca ADN să fie suprarăsucit. Presiunea de stivuire a proteinelor și forțele Van der Waals condensează genomul spermatocitelor într-o stare de împachetare care-l protejează în vederea transportului pentru fecundare. ADN se dispune în cercuri concentrice suprapuse ca un colac de sârmă sau torus.

Pentru a explica modul în care protaminele facilitează o astfel de împachetare, s-a propus următorul model: părțile centrale ale protaminelor bogate în Arg sunt localizate în adânciturile minore ale macromoleculei de ADN, astfel încât, gruparea Arg neutralizează sarcinile electrice negative ale ADN și elimină repulsia

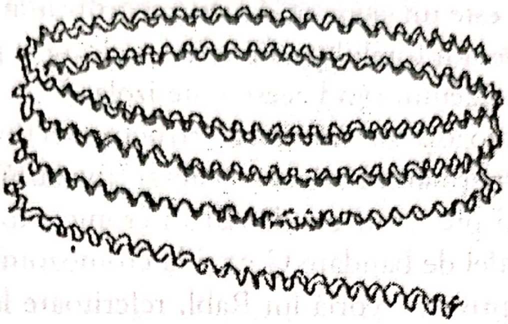


Fig. 20 — Unitatea fundamentală toroidală de împachetare a ADN cu protamine din nucleii spermatozoizilor.

electrostatică între segmentale vecine. Cozile protaminelor sunt localizate în adânciturile majore ale ADN adiacent, ceea ce permite legarea paralelă a moleculelor de ADN. (fig. 21)

3. Echivalentul solenoidic nu a fost încă pe deplin clarificat. Actualul model admite că, deoarece într-o tură a solenoidului există 13 supraînfășurări ale ADN, câte 2 pentru fiecare din cei 6 nucleosomi și una pentru solenoidul însuși, 11 din cele 12 încolăciri nucleosomale sunt transformate în încolăciri simple, rezultând 2 cercuri în spirală pentru fiecare tură a solenoidului.

4. Domeniile buclate reprezintă următorul nivel de organizare întâlnit și la celulele somatice, dar în nucleii spermatozoizilor de la mamifere (om, hamster) buclele au o dimensiune mai redusă. Domeniile buclate reprezintă aproape jumătate (47 Kb) din dimensiunile buclelor din celulele somatice ale hamsterului (76 Kb). S-a constatat că domeniile buclate de hamster și om, dar și de la păsări, sunt atașate de matricea nucleară, prin secvente specifice.

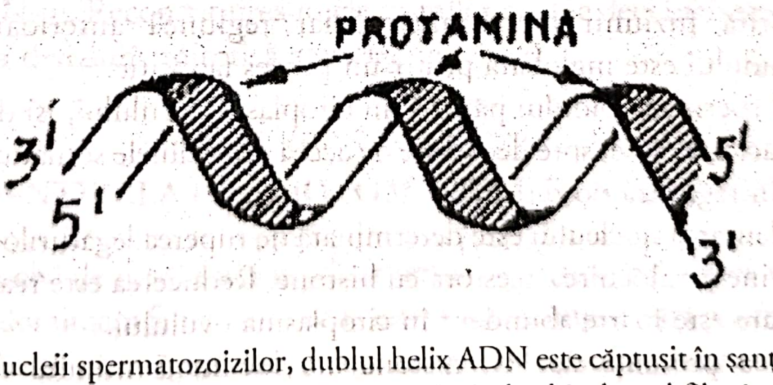


Fig. 21 — În nucleii spermatozoizilor, dublul helix ADN este căptușit în șanțurile minore cu protamine, complexul ADN-protamine constituind echivalentul fibrei nucleozomale din nucleii interfazici ai celulelor somatice.

Matricea nucleară este un element structural propriu nucleului, fiind alcătuit din mai puțin de 10% din totalul proteinelor nucleare și păstrează dimensiunea și forma originală a nucleului când acesta este izolat.

În nucleii spermatozoizilor nu există structuri echivalente cromozomilor mitotici, deoarece spermatozoizii nu suferă diviziuni. Totuși, ADN din spermatozoizi poate fi prematur condensat în cromozomi monocromatidici cu prezența aceluiași model de bandare G ca și la cromozomii mitotici din celulele somatice. În ceea ce privește teoria lui Rabl, referitoare la localizarea în poziții fixe, specifice, a diverșilor cromozomi, în interiorul nucleilor interfazici somatici, în nucleii spermatozoizilor cartarea secvențelor telomerice $(TTAGGG)_n$ a arătat că poziția telomerelor variază de la nucleu la nucleu. Acest lucru sugerează că diferiții cromozomi nu ocupă poziții precise în timpul spermiogenezei și că există o anumită plasticitate a aranjării spațiale a cromozomilor în interiorul nucleilor spermatozoizilor. Pe de altă parte, s-a arătat că secvențele repetate ale telomerelor sunt asociate strâns cu matricea nucleară.

După fuziunea gameților, nucleul spermatozoidului ajuns în citoplasma ovocitei devine pronucleu mascul. În continuare, acest pronucleu rămâne separat de pronucleul femel, propriu ovocitei, și suferă modificări structurale și biochimice, reactivându-se genetic.

Spermatozoizii maturați în epididim sunt capabili să se deplaseze, dar nu au capacitatea de a fertiliza ovulul. Această proprietate este dobândită în tractul reproducător femel. Totalitatea modificărilor fiziologice suferite de spermatozoid la trecerea prin tractul reproducător femel se numeste **capacitare**.

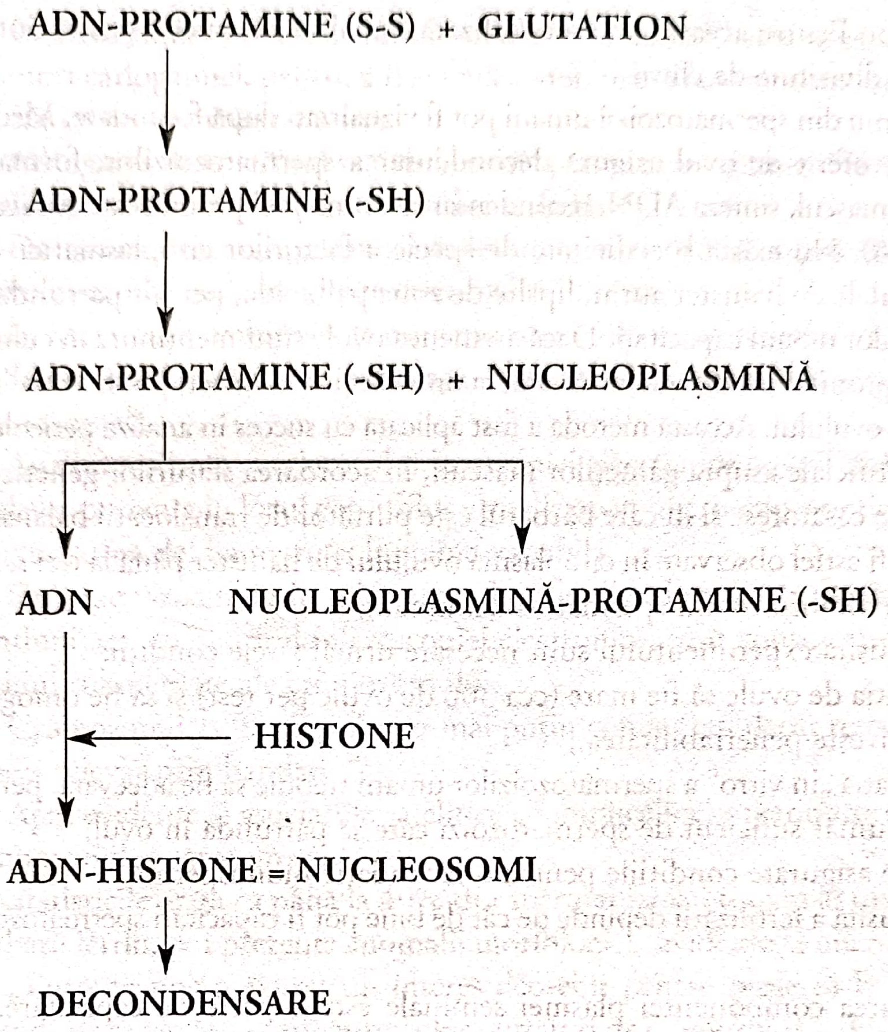
În timpul capacitării nucleii pierd ionii de zinc astfel încât, grupările -SH rămân libere, sunt oxidate și dau naștere punților disulfhidrice. De asemenea, au loc modificări ale membranei plasmatice ale spermatozoidului.

După fuziunea celor două membrane, spermatozoidul pătrunde în citoplasma oului. Regiunea posterioară a capului și coada spermatozoidului sunt înglobate pasiv datorită fuziunii membranelor, iar regiunea anterioară a capului spermatozoidului este înglobată printr-un proces fagocitic.

Nucleul spermatozoidului pătruns în citoplasma ovulului, își dezorganizează anvelopa nucleară, care, spre deosebire de aceea din celulele somatice, nu prezintă pori decât în regiunea posterioară.

Decondensarea nucleului este determinată de ruperea legăturilor disulfhidrice din protamine și înlocuirea acestora cu histone. Reducerea este realizată de către glutation care este foarte abundent în citoplasma ovulului.

Înlocuirea protaminelor cu histone are loc în 5 minute de la intrarea spermatozoidului în ou și se bazează pe competiția dintre nucleoplasmină și ADN pentru protamine.


ADN-PROTAMINE (S-S) + GLUTATION
ADN-PROTAMINE (-SH)
ADN-PROTAMINE (-SH) + NUCLEOPLASMINĂ
ADN
NUCLEOPLASMINĂ-PROTAMINE (-SH)
HISTONE
ADN-HISTONE = NUCLEOSOMI
DECONDENSARE

Fuziunea nucleilor la mamifere durează aproximativ 12 ore. Când nucleul spermatozoidului se decondensează, nucleul ovulului suferă a doua diviziune meiotică. După aceste procese, pronucleii migrează unul spre celălalt, timp în care își replică ADN-ul. Reconstituirea nucleosomilor are loc deci înaintea fazei S care precede prima diviziune mitotică a nucleului.

14. EVIDENȚIEREA CROMOZOMILOR DIN SPERMATOZOIZI

Factorii nocivi de mediu pot produce leziuni genetice. Stabilirea nivelului de lezare a gameților umani femeli și masculi este de mare importanță pentru aprecierea riscului pe care utilizarea agenților mutageni îl prezintă pentru generația următoare.

Analiza cromozomală a ovocitelor și spermatocitelor umane oferă posibilitatea de estimare a proceselor de non-disjuncție meiotică cu efecte foarte grave asupra descendenților. Pentru aceasta, trebuie realizată o analiză a celulelor postmeiotice sau în prima diviziune de clivaj.

Cromozomii din spermatozoizii umani pot fi vizualizați după fecundare. Mediul citoplasmatic oferit de ovul asigură decondensarea spermatozoizilor, formarea pronucleului mascul, sinteza ADN, recondensarea cromatinei pronucleare și clivajul (Longo, 1985). Nu există specificitate de specie a factorilor citoplasmatici. De exemplu, ovulele de hamster auriu, lipsite de zona pellucida, permit pătrunderea spermatozoizilor umani capacitați. Dacă asemenea ovule sunt menținute în culturi, cromozomii pronucleari din metafază atât la om, cât și la hamster, pot fi vizualizați în citoplasma ovulului. Această metodă a fost aplicată cu succes în analiza pericolelor naturale și artificiale asupra gameților masculi, în acordarea sfaturilor genetice la cuplurile ce se căsătoresc și în care bărbatul este purtător de translocații balansate.

Au putut fi astfel observate în citoplasma ovulului de hamster până la trei seturi haploide de cromozomi din spermatozoizii umani.

Pentru reușita experimentului sunt necesare următoarele condiții:

1. populația de ovule să fie mare (cca 300 de ovule per test) și să fie omogenă în ceea ce privește penetrabilitatea ;
2. capacitația „in vitro“ a spermatozoizilor umani trebuie să fie adecvată, pentru a exista un număr suficient de spermatozoizi care să pătrundă în ovul;
3. trebuie asigurate condițiile pentru o fecundație monospermă.

O rată reușită a fertilizării depinde de cât de bine pot fi capacitați spermatozoizii „in vitro“.

Îndepărtarea componentei plasmei seminale este o parte de capacitare. Se realizează o preincubare a probelor de spermă proaspăt ejaculate (3-6 ore) în mediu ce conține Glc, piruvat, lactat și albumină serică umană (HAS). Astfel, spermatozoizii umani devin capabili de a penetra ovulele de hamster auriu.

Tratamentul de scurtă durată al spermatozoizilor umani înainte de incubarea în mediu BWW cu ionofor A23187, care conține cationii metalici bivalenți, accelerează procesul de capacitare al spermatozoizilor, minimalizând variabilitatea interindividuală a timpului de capacitație,variație care se întinde de la 2-22 ore.

Coincubarea gameților se face numai după ce este îndepărtată zona pellucida a ovocitelor.

M II recoltate și, în acest fel, sunt dereglate mecanismele ce previn polispermia, astfel că, la coincubarea gameților, mai mulți spermatozoizi penetrează același ovocit M II. Acest proces poate deveni un avantaj pentru investigație, deoarece este permisă vizualizarea în același ovocit a mai multor seturi de cromozomi spermatici.

Timpul de coincubare a ovulelor M II cu spermatozoizii capacitați durează 2-3 ore.

Etalarea bună a cromozomilor adecvat condensați, trebuie să se asocieze cu blocarea cariogamiei, pentru a fi evitată suprapunerea cromozomilor pronucleilor de om cu cei de hamster auriu.

Adăugarea de colcemid sau vinblastină previne cariogamia și formarea fusului de diviziune din cadrul primei diviziuni de clivaj.

De asemenea, citoplasma ovulelor mature de *Xenopus laevis* permite dezvoltarea pronucleară a spermatozoizilor umani.

În Metafază s-a observat la unul sau mai mulți cromozomi un gol în regiunea mediană, atunci când se utilizează tehnica Giemsa sau tehnica de bandare cromozomală.

Analiza realizată cu ajutorul microscopiei electronice (atât TEM, cât și SEM) a relevat prezența în locul gap-urilor vizualizate în microscopie optică a unor fibre de cromatină de diametru și lungime variabilă.

Golurile vizualizate în microscopul optic, dar dovedite a reprezenta zone de continuitate, cu ajutorul microscopiei electronice, sunt considerate a reprezenta regiuni submetilate ale cromozomului.

Cromozomii 1, 9, 16 și Y apar mai puțin condensați decât restul cromatinei, aspect relevat prin bandare C.

Apar evidente și asociațiile satelitice ce implică loci organizatori nucleolari ai cromozomilor acrocentrici.

Statisticile arată că până la 40% din spermatozoizii umani ai unui ejaculat, la bărbații fertili, pot prezenta anomalii morfologice, evidente la microscopul optic.

Dintotdeauna a existat un interes deosebit pentru punerea la punct a unei metode de separare a spermatozoizilor purtători de cromozomi X de cei care poartă cromozomul Y.

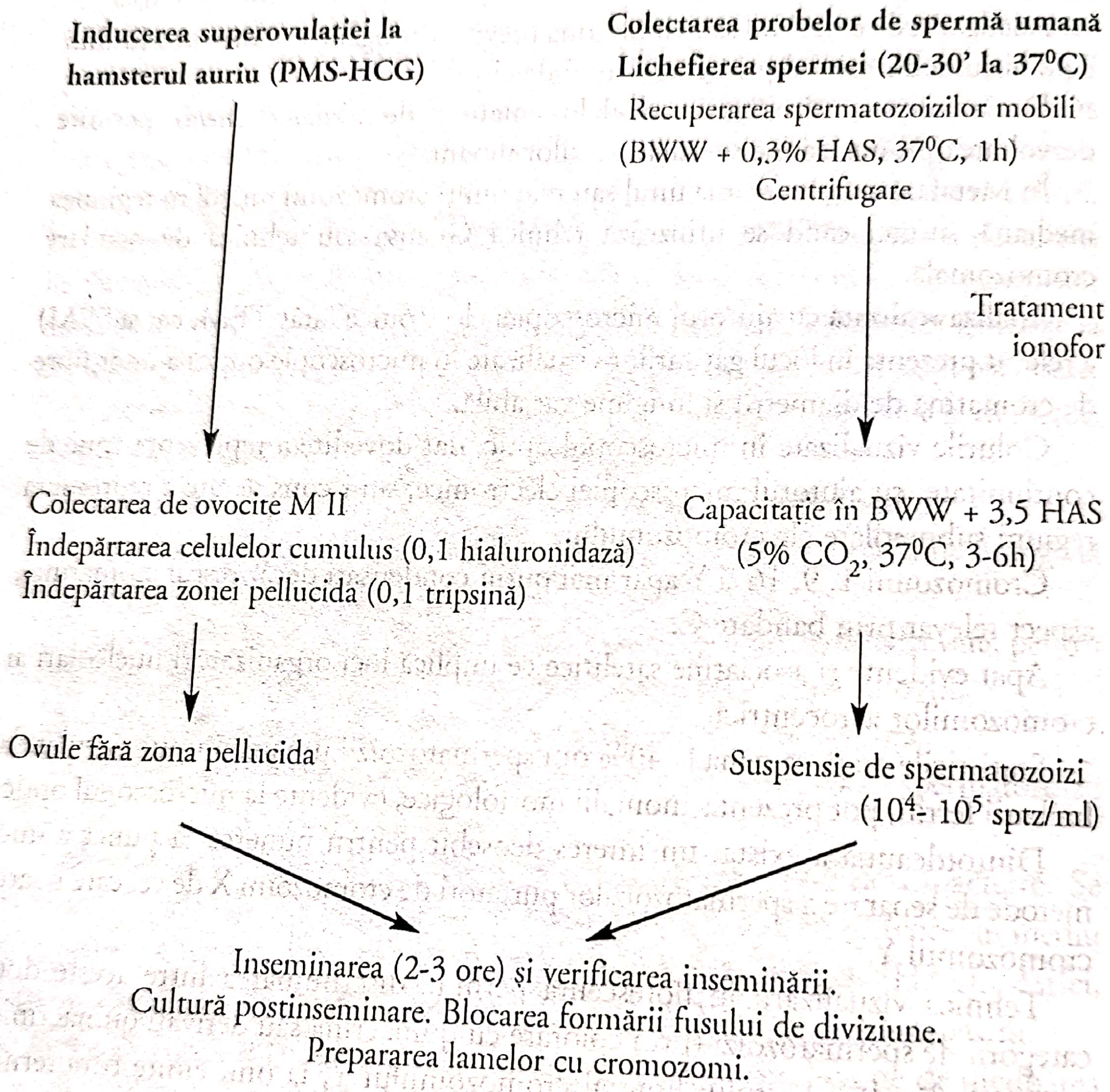
Tehnica vizualizării în florescență permite discriminarea între aceste două categorii de spermatozoizi (prin colorare cu quinacrină sau derivați quinacrinici, poțiunea distală a brațului lung al cromozomului Y, la om, emite o puternică fluorescență luminoasă, sub acțiunea razelor UV, și acest corpuscul intens fluorescent poartă denumirea de **cromatină Y**).

Utilizarea acestei metode a evidențiat existența unei abateri de la raportul teoretic de 1:1 dintre cele două categorii de spermatozoizi, în favoarea spermatozoizilor cu cromozom X.

Procentul mediu de spermatozoizi cu cromozomi Y, la bărbații normali, este de 43,3 ± 2,2%.

Analiza cromozomilor spermatici este foarte importantă și în evidențierea aberațiilor cromozomale induse de diferiți clastogeni naturali și sintetici, putându-se monitoriza efectul acestora asupra genomului gameților și implicit asupra fertilității masculilor.

15. ETAPELE TEHNICII DE EVIDENȚIERE A CROMOZOMILOR DIN SPERMATOZOIZI



Inducerea superovulației la hamsterul auriu (PMS-HCG)

Colectarea probelor de spermă umană
Lichefierea spermei (20-30' la 37^{0}C)
Recuperarea spermatozoizilor mobili
(BWW + 0,3% HAS, 37^{0}C, 1h)
Centrifugare

Tratament ionofor

Colectarea de ovocite M II
Îndepărtarea celulelor cumulus (0,1 hialuronidază)
Îndepărtarea zonei pellucida (0,1 tripsină)

Capacitație în BWW + 3,5 HAS
(5% CO_2, 37^{0}C, 3-6h)

Ovule fără zona pellucida

Suspensie de spermatozoizi
(10^4- 10^5 sptz/ml)

Inseminarea (2-3 ore) și verificarea inseminării.
Cultură postinseminare. Blocarea formării fusului de diviziune.
Prepararea lamelor cu cromozomi.

Capitolul XXI

CONSIDERAȚII GENERALE PRIVIND FENOMENUL DE AMPLIFICARE GENICĂ

1. COMPLEMENTUL CROMOZOMAL ȘI REDUNDANȚA GENETICĂ

Cromozomii eucariotelor reprezintă entități genetice ale genomului eucariot, purtători ai genelor, fiind deci genoforii eucariotelor.

Cromozomii eucariotelor sunt structuri sub care se organizează cromatina nucleului interfazic la debutul diviziunii nucleului, în urma unor procese de spiralizare progresivă și condensare a fibrelor de cromatină interfazică, aflate într-o stare de despiralizare extremă față de gradul de condensare pe care acestea îl ating la nivelul cromozomilor metafazici. Deci, structural, cromozomii au ca fundament fizic fibra de cromatină și, de fapt, aceste structuri sunt permanente în ciclul celular.

Caracteristică pentru covârșitoarea majoritate a eucariotelor este existența unui ciclu al condensării și decondensării cromozomale. Condensarea progresivă începe de la debutul diviziunii, în profază, când are loc individualizarea cromozomilor din cromonemele interfazice în număr, de formă și cu dimensiuni caracteristice fiecărei specii. Gradul maxim de condensare fiind atins în metafază, când cromozomii prezintă cea mai constantă dimensiune și morfologie tipică speciei considerate. Decondensarea începe din telofază și este deplină la începutul interfazei, când cromozomii își pierd individualitatea metamorfozându-se în cromoneme. Starea despiralizată a cromozomilor este propice proceselor replicative și transcripționale.

Cromozomii, deținătorii informației ereditare, sunt în număr, formă și mărime caracteristice fiecărei specii. Totalitatea cromozomilor unei celule formează COMPLEMENTUL CROMOZOMAL al acestei celule.

Numărul de cromozomi din gameți, numit și număr haploid de cromozomi (n) conține un set complet de gene și constituie GENOMUL speciei. Celulele diploide (2n) au două seturi haploide de cromozomi, unul de proveniență maternă și unul de proveniență paternă. Aceste seturi sunt omoloage. Ca urmare, starea diploidă este primul nivel de redundanță genetică la eucariote.

În celulele sexuale, numărul de cromozomi pentru fiecare specie se păstrează constant, variațiile numerice apărând numai în celulele somatice. Speciile evoluate au, de regulă, un complement cromozomal constant și orice variație a numărului de cromozomi este însoțită de grave anomalii fenotipice.

Cromozomii și genele nu apar „de novo“, ci din structuri preexistente.

Apariția de gene noi se poate realiza pe calea duplicației genice, prin crossing-overe inegale între cromozomii omologi, replicație eronată a ADN, extrareplicare în faza G1 a ciclului celular, reverstranscriere, etc.

Prin **duplicație genică**, o copie sau câteva copii ale unei gene sunt adăugate prin inserție longitudinală de-a lungul cromozomului, realizându-se redundanța genelor, fenomen universal în lumea vie, cu excepția bacteriilor și a cianobacteriilor (Britten și Kohne, 1969).

Creșterea numărului de gene se poate realiza și prin **amplificare genică**. Astfel, multiple copii sunt adăugate lateral. Amplificarea este însă limitată la nivelul liniei germinale, pe când redundanța apare în majoritatea, dacă nu în toate tipurile de țesuturi.

Al treilea mecanism de creștere a numărului de copii genice este **politenia**, care, ca și amplificarea, implică adiție laterală și nu longitudinală de gene (ca în cazul duplicației genice), și nu implică multiplicarea întregului set de gene. În acest caz, are loc o replicare diferențiată a ADN, existând zone subreplicate și zone cu replicare în exces sau extrareplicate.

Al patrulea mecanism de creștere al numărului de copii genice este **endoreduplicarea**. În acest caz sunt copiate toate genele iar aceste copii sunt adăugate lateral, dar nu vin în contact intim ca în politenie. Endoreduplicarea este un proces intermediar între politenie și poliploidie în ceea ce privește gradul de separare a copiilor. Cromozomii endoreduplicați păstrează aspectul cromozomilor mitotici dar nu sunt deplin separați ca în poliploidie, sunt asociați lateral, dar sunt mai scurți și mai groși decât cromatidele cromozomilor politeni.

Poliploidia este cel de al cincilea proces de multiplicare al numărului de copii genice. Ea reprezintă cel mai simplu, cel mai eficient și cel mai răspândit mecanism (în special la plante) de creștere a cantității de informație genetică.

2. FAZELE CICLULUI CELULAR ȘI EVENIMENTELE CORESPONDENTE ACESTORA ÎN CAZUL AMPLIFICĂRII GENICE

În interiorul nucleului, cromozomii decondensați ocupă poziții particulare, atașându-se cu ajutorul centromerilor, telomerelor sau a altor situsuri, de membrana nucleară sau de complexele porale.

Alți constituienți ai nucleului sunt: nucleoplasma care probabil conține nucleotide și proteine, nucleolul care e compus dintr-o regiune organizator nucleolară activă și produși de sinteză (preribozomi) și o cantitate variabilă de granule ribonucleoproteice (ribozomi și informozomi, de exemplu ARNr și ARNm cuplați cu proteine).

Anvelopa nucleară prezintă numeroase invaginări, acestea fiind structuri funcționale ce indică o înaltă activitate de schimb nucleocitoplasmatic. Transferul macromoleculelor din citosol în nucleu, sau din nucleu în citosol poate fi influențat de numărul variabil de pori nucleari.

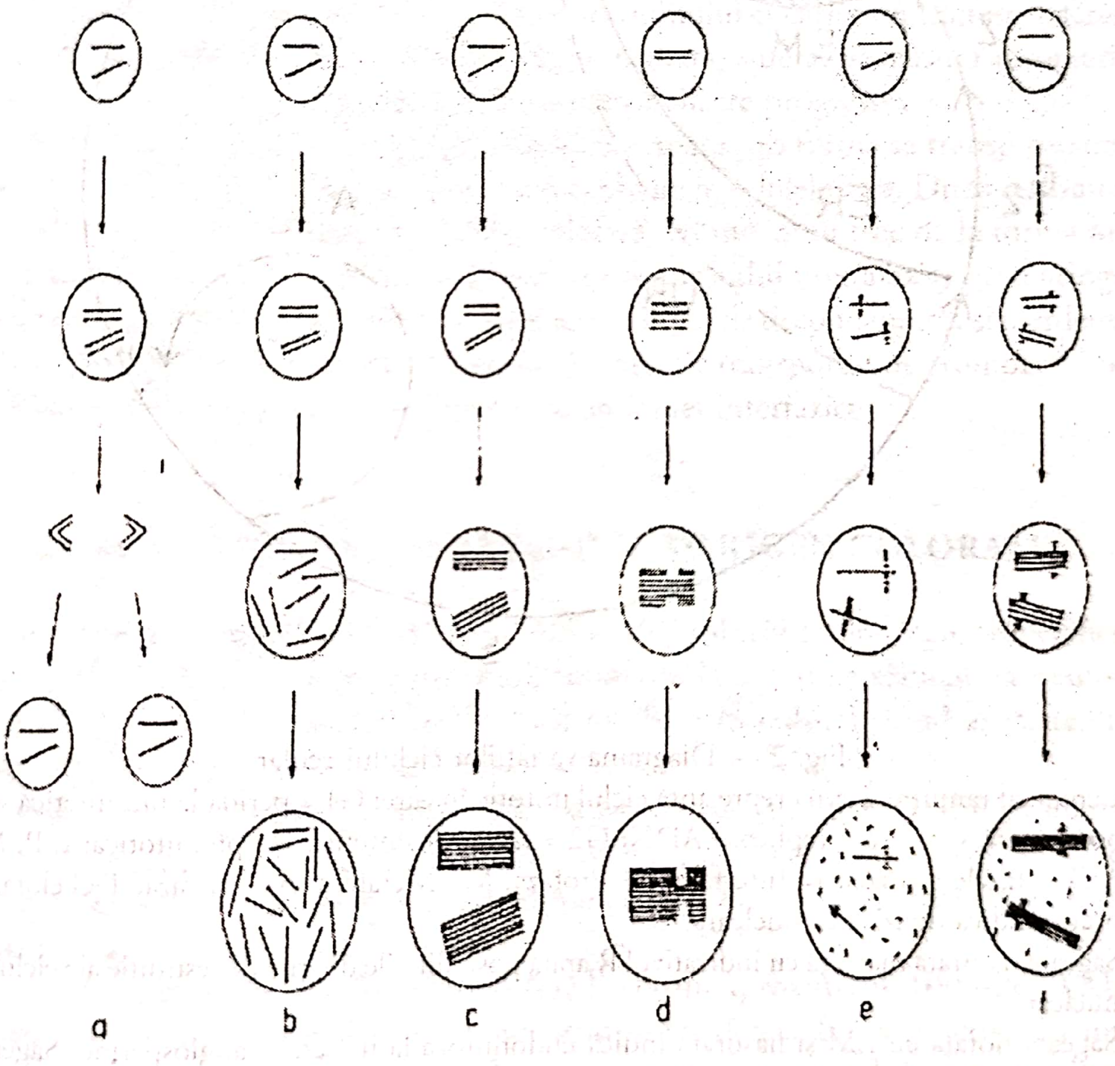


Fig. 1 — Consecința variației ciclului celular și a celui nuclear la organismele superioare (după Nagl W., 1974). Fiecare bară lungă indică genomul haploid, iar bara scurtă reprezintă o genă oarecare (sau o secvență ADN). a) ciclul miotic; b) ciclul endomiotic; c) ciclul de endoreduplicare sau politemizare; d) ciclu de subreplicare; e) amplificare genică; f) ciclu de endoreduplicare-amplificare.

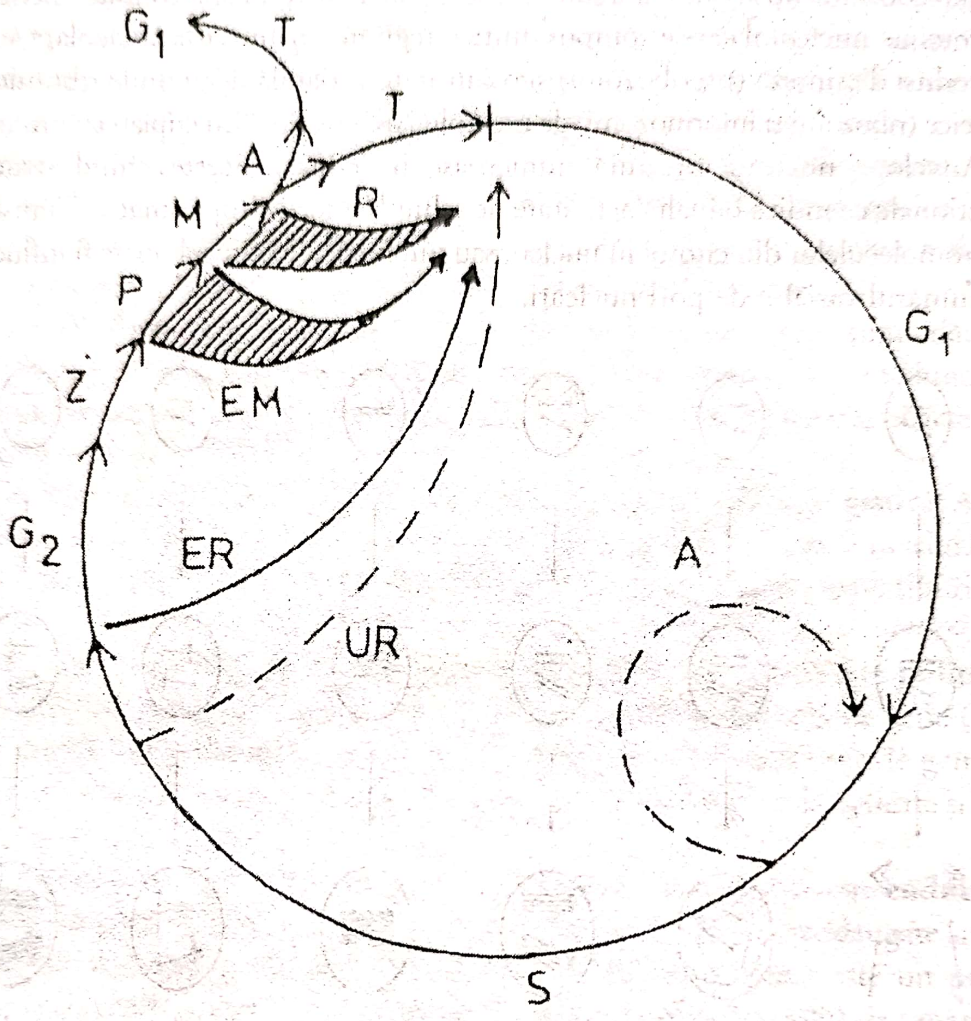


Fig. 2 — Diagrama variațiilor ciclului ceular.
Cercul cu ramura externă reprezintă ciclul mitotic în care: G1 = perioada presintetică sau postmitotică; S = faza replicării ADN; G2 = faza postsintetică sau premitotică; I, P, M, A, T= fazele mitozei: I= Interfaza, P= Profaza, M= Metafaza, A= Anafaza, T=Telofaza; brațul indică diviziunea nucleară.
Săgeata hașurată marcată cu indicativul R arată posibilitățile diferite de restituție ale ciclului nuclear.
Săgeata notată cu EM și hașurată indică endomitoza la insecte și angiosperme. Săgeata ER arată traseul ciclului de endoreduplicare. Săgeata punctată UR arată traseul unui endociclu cu subreplicarea anumitor secvențe de ADN (evidențiază porțiunile cu replicare târzie, deci heterocromatina și ADN satelit). Săgeata punctată A arată un ciclu de amplificare (o porțiune a genomului care este amplificată poate fi replicată mai devreme sau mai târziu în cursul ciclului celular normal; localizarea săgeții poate fi considerată variabilă) (după Nagl, 1978).

Trecerea cromozomului eucariot de la structura unicromatidică (din anafază până în stadiul S al interfazei) la structura bicromatidică (de la sfârșitul stadiului S până la sfârșitul metafazei) și revenirea la structura unicromatidică, se realizează prin mecanisme replicative complexe, urmate de mecanisme distributive în care intervenția fusului de diviziune este esențială, asigurând repartizarea echilibrată a produșilor de replicare. Fiecărei cromatide a cromozomului îi corespunde o singură fibră de cromatină, pliată transversal și longitudinal după un model care redă morfologia cromozomului metafazic. La nivelul constricției primare, cele două fibre nucleohistonice ale cromozomului metafazic bicromatidic se interdigitează.

Cele două fibre nucleohistonice ale cromozomului eucariot replicat în vederea diviziunii, reprezentând cromoneme (cromonemata) suferă, pe măsura apropierii diviziunii, un proces de condensare și superspiralizare progresivă.

În timpul diviziunii, cromozomul eucariot apare sub forma sa transportoare, forma cerută de o echilibrare a informației ereditare în celulele fiice. După realizarea acestei repartizări ce are loc în anafază-telofază, cromozomii trec de la forma lor transportoare la o formă funcțională în cadrul nucleului interafazic, când atinge gradul maxim de despiralizare a cromatidelor, însoțită de decondensarea și pierderea individualității cromozomului. Materialul cromatic transportat de cromozomi în nucleii fii se va organiza sub înfățișarea cromatinei interfazice.

3. DUBLU MINUSCULI ȘI REGIUNI OMOGEN COLORATE

Acestea sunt structuri care apar ca rezultat al amplifcării unor regiuni specifice ale cromozomilor, respectiv genomului, întâlnite la om și, ocazional, la mamifere, și apar mai frecvent, în liniile celulare aflate în cultură, fiind asociate cu rezistența la medicamente antimetabolice.

Clasic a devenit cazul amplificării genei dihidrofolatreductazei (DHFR) realizată ca o consecință a chimioterapiei cancerului cu methotrexat (MTX). De asemenea, ele sunt asociate cu multe forme de cancere, apărând frecvent în linii celulare tumorale.

Dublu minusculi (*double-minutes*) (DM) conțin aproximativ 1000-2000 Kb ADN și sunt autoreplicative, neavând centromeri detectabili sau activi. Ei nu participă în mod normal în diviziunea mitotică, segregând într-o manieră randomică și producând o distribuție inegală în celulele fiice. Ei pot fi pierduți prin micronucelație, proces similar cu cel întâlnit în cazul univalenților. În liniile celulare rezistente la MTX se întâlnesc până la 20 DM.

Regiunile omogen colorate (*Homogenous Staining Region*)(HSR) sunt regiuni cromozomale mari de material amplificat, nebandat. Dimensiunea HSR este direct proporțională cu secvența amplificată și nivelul de amplificare. Amplificarea are loc la situsul în care se află localizată gena implicată. De exemplu, în rezistența de droguri, la șoarece, în liniile celulare rezistente la MTX, acest situs se află în mijlocul cromozomului 2, unde este localizată gena *dhfr* care produce rezistența la acest drog.

HSR multiple pot să apară în celule, ca rezultat al numeroaselor evenimente de amplificare sau al ruperii și translocării HSR original.

DM –urile sunt considerate a fi precursori instabili ai HSR-urilor, fapt dedus din constatarea că, cu cât liniile celulare rezistente la droguri sunt mai îndelungat cultivate, cu atât mai extinsă este substituirea DM-urilor cu HSR-uri.

DM pot fi eliminate din liniile celulare tumorale de mamifere prin tratarea cu concentrații joase de hidroxiuree, fară a fi afectate HSR-urile.

Absența DM și HSR dintr-o linie celulară rezistentă la droguri sau transformată malign nu trebuie interpretată ca semnificând absența amplificării, ci mai curând ca acest proces a apărut, dar la un nivel nedetectabil. Pentru moment, nu se știe dacă amplificarea este legată fie de inițierea, fie de progresia bolii maligne.

Amplificarea apare, după toate probalilitățile, prin replicare disproporționată. Replicarea poate fi inițiată în aceeași origine sau în apropierea acesteia, de mai

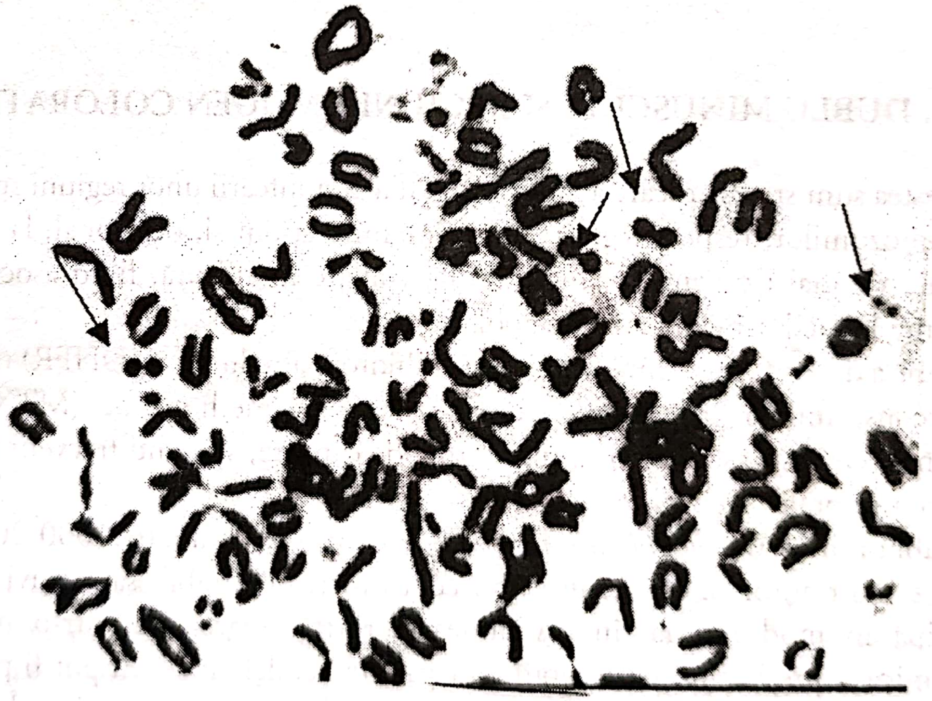


Fig. 3 — Poliploidie indusă prin iradiere γ la șoarece. Se constată prezența a numeroase structuri *double-minutes* (săgețile, interpretate ipotetic de către Gavrilă și colab. (2002) drept rezultat al amplificării genelor pentru componentele telomerazei (original).

multe ori în cadrul oricărei faze S date a unui ciclu celular. In plus, replicarea ADN și procesul de elongație încetinește sau se oprește la un situs din cromozom înainte de a se uni cu o altă bifurcație de replicare dintr-o origine de replicare adiacentă.

Consecința acestor runde adiționale de replicare este producerea de multiple catene de ADN atașate la cromozom la un anumit situs, creându-se o structură ce este comparabilă cu bulbul de ceapă, catenele multiple fiind reprezentate de foițele suprapuse ale bulbului de ceapă. Aceste catene extranumerice pot fi eliberate fie sub formă liniară, fie sub formă circulară. În absența presiunii selective, acestea pot fi pierdute din celulă, fără nici un efect. În prezența selecției, reprezentată de exemplu, de aplicarea drogurilor, replicarea și ligarea acestor catene pot genera DM-uri. Legarea cap-la-cap, urmată de recombinare cu un cromozom poate produce HSR-uri. Rezultă că, atât geneza DM-urilor, cât și a HSR-urilor implică mașinăria nucleară de replicare.

CAPITOLUL XXII

CROMOZOMII POLITENI LA DIPTERE

1. INTRODUCERE

Organismele unicelulare de tip procariot, cum sunt bacteriile sau de tip eucariot cum sunt protozoarele, au o mare capacitate de adaptare la condiții variate de mediu, astfel că, ele reprezintă în prezent peste 50% din biomasa Terrei.

Apariția eucariotelor mai evoluate a făcut posibilă trecerea la organismele multicelulare care prezintă mari avantaje selective, exploatând mai eficient resursele de mediu. Aceasta a însemnat și apariția specializării celulelor pentru funcții diferite în cadrul aceluiași organism, adică s-a realizat **DIFERENȚIEREA CELULARĂ** sau **CITODIFERENȚIEREA** .

Nagl (1977, 1978) a elaborat modelul optimizării ADN conform căruia, o celulă specializată are nevoie de o anumită cantitate de ADN pentru a funcționa eficient. De aceea, atât în filogenie cât și în ontogenie, se observă o mare variație a cantității de ADN.

Prin cicluri endomitotice și endoreduplicare are loc o creștere considerabilă a cantității de material genetic celular. În primul caz au loc procese de evoluție structurală a cromozomilor comparabile cu mitoza, dar care se desfășoară în interiorul nucleului celular, fără dezorganizarea membranei nucleare; în cazul secund, cromozomii suferă procese parțiale de condensare și de replicare succesivă, fără separarea cromatidelor, ceea ce conduce la apariția structurilor politene.

De asemenea, replicarea diferențiată a ADN are rol în variația cantității de material genetic . În endocicluri se observă subreplicarea anumitor regiuni ale ADN după cum se observă și suprareplicarea sau amplificarea altor regiuni.

Amplificarea este o etapă a diferențierii timpurii, pe când subreplicarea este restrânsă la etapa finală a diferențierii.

În contextul replicării diferențiate a ADN ca un mecanism posibil al diferențierii celulare, evenimentele amplificării în secvențele codificatoare și necodificatoare ce apar în celulele somatice sunt de un interes special. Exemplul de replicare diferențiată cel mai cunoscut îl reprezintă pufele ADN din glandele salivare ale insectelor Sciaride.

În cursul dezvoltării, gene individuale sau seturi de gene pot fi în mod specific amplificate în stadii precise ale dezvoltării.

În celulele somatice amplificarea genică permite celulelor să depășească deficiențele în activitatea enzimatică esențială.

În opinia cercetătorilor, amplificarea ADN este considerată ca unul din cele mai importante mecanisme ale evoluției genomului eucariotelor. Rezultatele amplificării genice „in vivo" și „in vitro" sugerează că „șansa" joacă un rol mult mai redus decât pretinde punctul de vedere neo-darwinist.

2. ISTORIC

Studiul asupra cromozomilor politeni a început în anul 1880, când profesorul Balbiani, de la Universitatea din Paris, a descoperit și a descris aceste structuri in nucleii celulelor glandelor salivare de la larvele de *Chironomus plumosus*.

Cinzeci de ani mai târziu, în 1930, Kostoff, și, în 1933, Painter, descriu cromozomii uriași în nucleii celulelor glandelor salivare de la *Drosophila melanogaster*.

Cromozomii politeni (giganți sau uriași) se întâlnesc la un număr limitat de organisme.

Din marea grupă a nevertebratelor, cromozomii politeni sunt prezenți doar la insecte. Cassagnau i-a descris în celulele glandelor salivare de la numeroase specii de *Collembole*.

În stadiile larvare, nucleii politeni au fost reperați nu numai în glandele salivare, ci și în numeroase alte țesuturi: epiteliu intestinal, rect, tubi Malpighi, corpi grași, celule ganglionare, musculare, traheale. La adulți se întâlnesc în celulele hrănitoare ovariene, tubi Malpighi și glande accesorii genitale la femele.

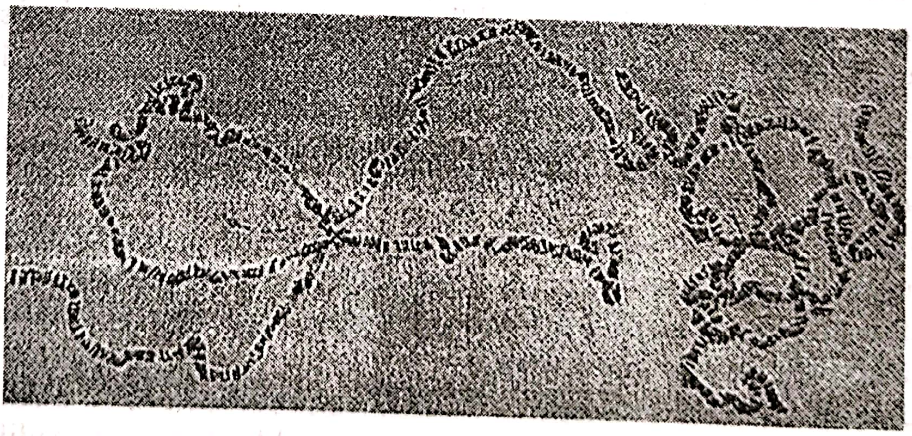


Fig. 1 — Cromozomi politeni la *Drosophila melanogaster* (sursa: www.bio.sbcc.net).

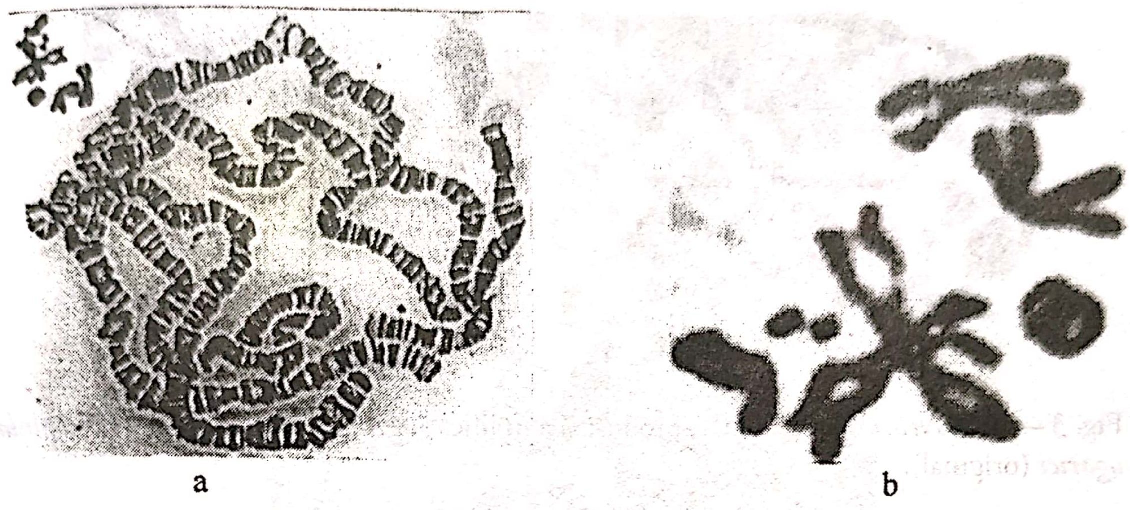


Fig. 2 — a) Complementul cromozomal la *Drosophila melanogaster*; în medalionul din stânga cromozomii obișnuiți, mitotici; b) complementul diploid (2n=8) la *Drosophila melanogaster*. (după Ster și Balaban, 1967; Kaufmann, 1969).

La mamifere, cromozomii politeni se întâlnesc în celulele gigante ale trofoblastului la șoarece, iepure și șobolan (*Microtus arvalis, Mus musculus, Orychtolagus cuniculus, Rattus rattus*). La acestea, cromozomul heterocromatic X, inactivat de la femele, este aparent politenizat, el apărând ca o cromatină sexuală gigantă (Zybina și Mosjan, 1967; Nagl, 1972). O observație similara a fost făcută de Gillot (1968) în nucleii poliploizi din glandele sericigene de la viermele de mătase (*Bombyx mori*) (Nagl, 1978).

3. ORGANIZARE STRUCTURALĂ (MORFOLOGIE)

Cromozomii politeni își au originea în cromozomii complementului cromozomal normal din celulele somatice care se divid mitotic până la un moment dat când intră într-un ciclu de endoreduplicare (își replică materialul genetic de nenumărate ori, dar fiecare rundă de replicare nu este urmată de diviziunea nucleului, numeroasele runde de sinteză a materialului cromatic având loc în interiorul aceluiași nucleu).

Rezultatul endoreduplicării este geneza unui număr mare de cromatide care rămân într-o dispoziție paralelă, constituind o structură politenă (fenomenul politeniei însemnând tocmai sinteza de cromatide multiple ce rămân atașate, neseparându-se în cromozomi fii). Din această cauză, cromozomii uriași au mai fost denumiți și cromozomi politeni (în l. gr. *polis — multiplu, tenos — filament*).

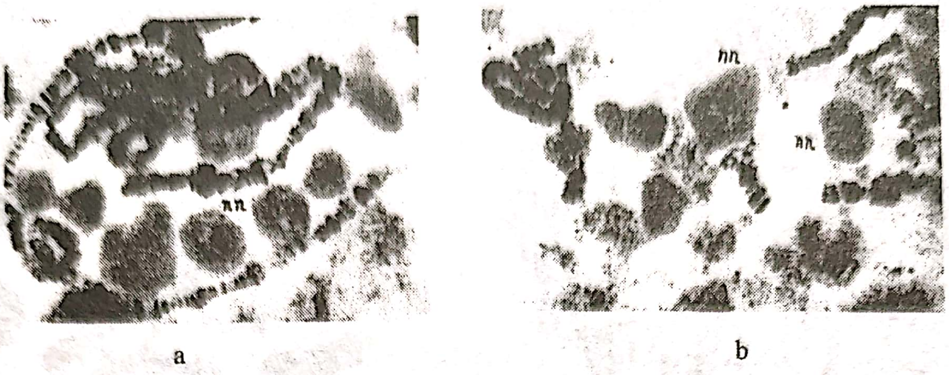


Fig. 3 — a, b. *Nebennucleoli* (nn) – produși ai amplificării genice ribozomale la *Mycetophila agarici* (original).

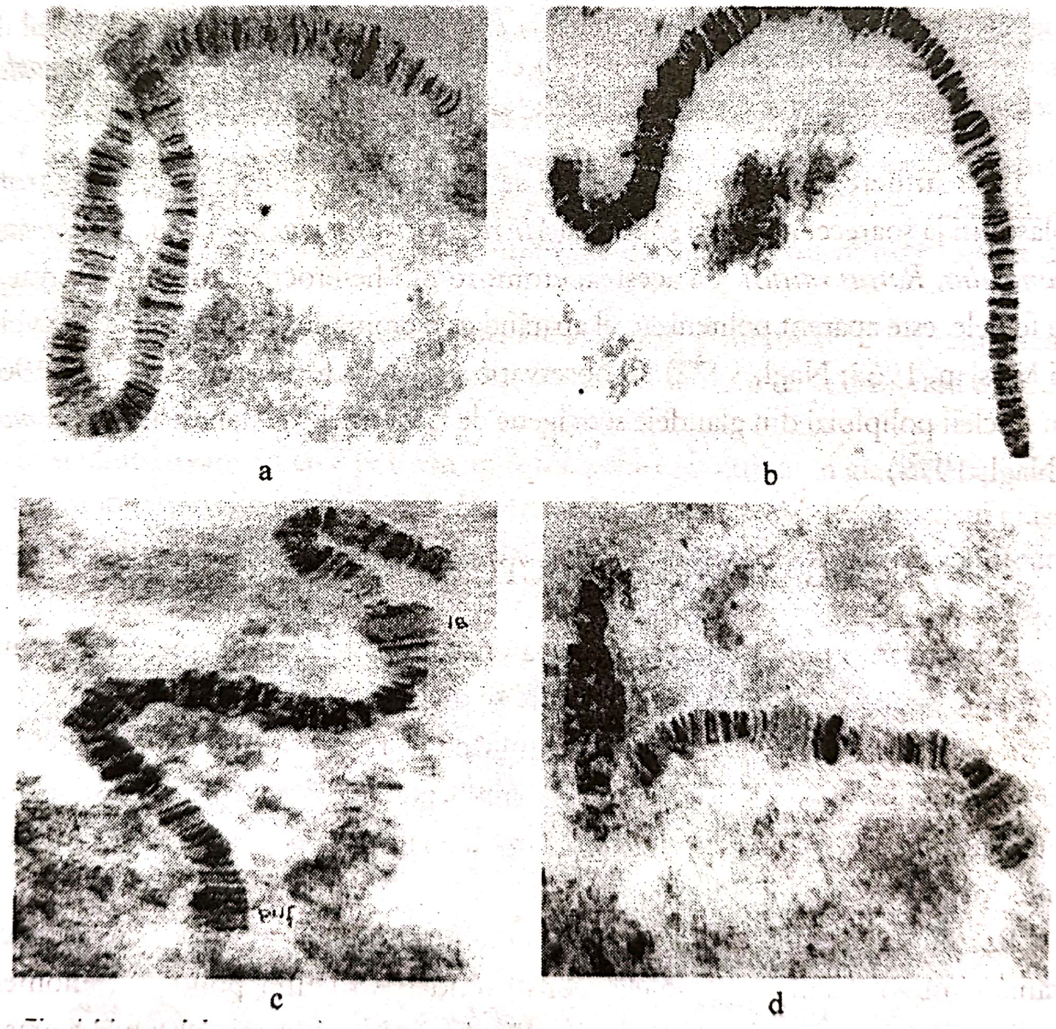


Fig. 4 — *Mycetophila agarici* a) – cromozomul politen I; b) – cromozomul politen II; c) – cromozomul politen III; d) – cromozomul politen IV (IB= inel Balbiani) (original).

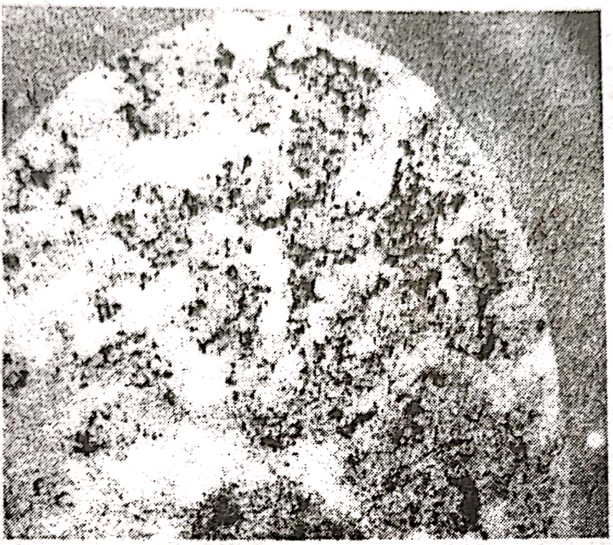
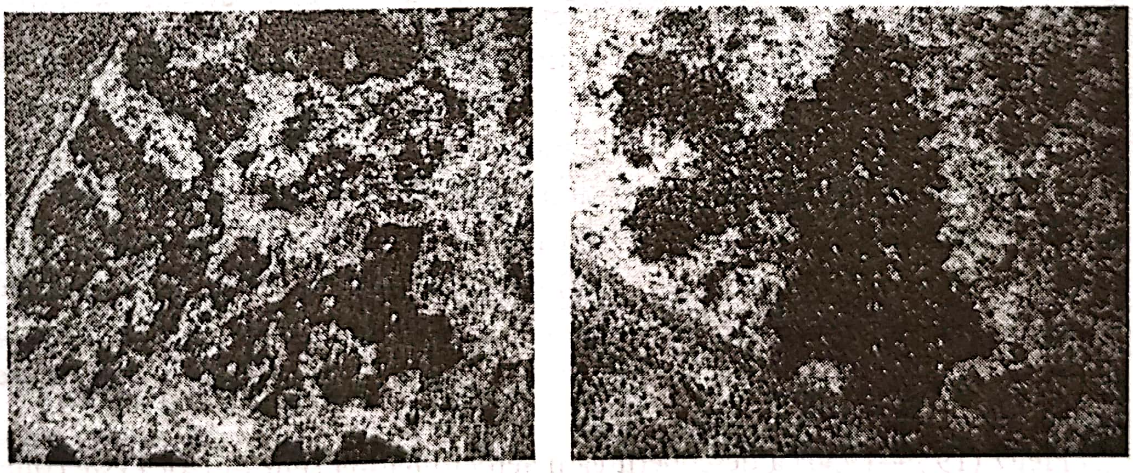


Fig. 5 — Nucleu apoptotic la *Mycetophila agarici* – imagine electronomicroscopică (original)



a

b

Fig. 6 — a) *Mycetophilia agarici;* blocuri heterocromatice dispuse la periferia nucleului (original); b) *Mycetophilia agarici* imagine de detaliu (original)

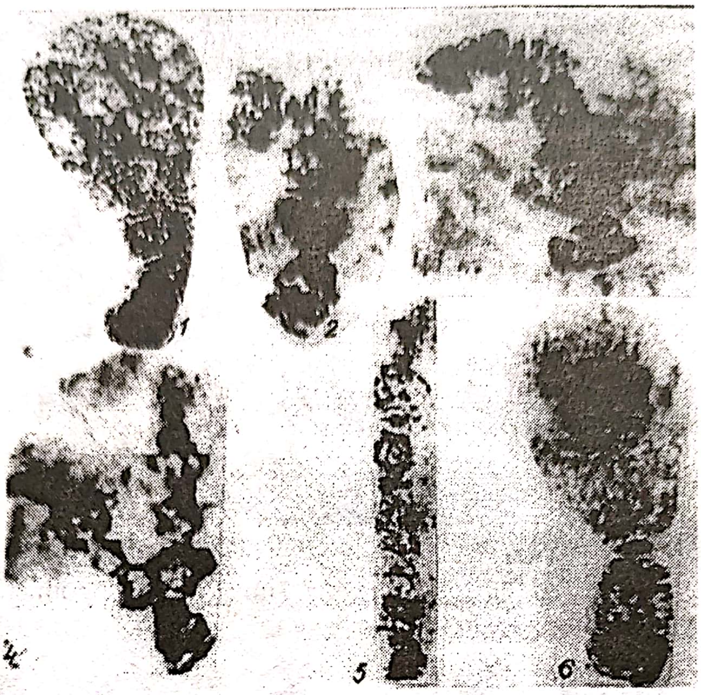


Fig. 7 — Cromozomi organizatori nucleolari la *Chironomus plumosus* (original).

Un aspect important înregistrat odată cu desfășurarea endociclurilor în cadrul procesului de politenie este împerecherea cromozomilor. Este o împerechere de omologi ca și în meioză dar, deoarece se desfășoară în celulele somatice, s-a numit **împerechere somatică**. Pentru realizarea ei nu este necesară formarea complexelor sinaptonemale, ca în împerecherea meiotică.

Paralel cu politenizarea are loc și unirea centromerilor tuturor cromozomilor într-o structură heterocromatică colectivă, evidentă, denumită **cromocentru.**

În cromocentru este încadrat și cromozomul Y heterocromatic de la mascul care, nefiind omolog cu X, nu realizează sinapsa. Datorită faptului că acest segment nu este politenizat la același nivel cu segmentele eucromatice, el nu este foarte mare.

La *Anopheles*, *Chironomus* (fig. 8,9) și *Mycetophila* (fig. 3,4) în procesul de politenizare lipsește etapa de formare a cromocentrului. Același lucru se constată și la insecta acvatică *Corethra* sp. (fig. 16). La aceste specii, brațele cromozomale sunt izolate, independente.

Heitz (1933–1934) a descoperit că heterocromatina centromerică este compusă din două tipuri de heterocromatină: α- heterocromatină și β — heterocromatină.

α– heterocromatina, cea mai compactă, nu crește in timpul procesului de politenizare. Astăzi, acest fenomen este cunoscut sub numele de **heterocromatină subreplicată.**

Există și specii unde, dimpotrivă, la nivelul centromerilor are loc o creștere a heterocromatinei. Acest fenomen nu a fost încă bine studiat prin tehnici moleculare, dar Keyl (1962), prin măsurători citofotometrice, a găsit că ADN din heterocromatină este constant, deci amplificarea heterocromatinei poate fi exclusă (Nagl, 1978).

Pe parcursul procesului de politenizare s-au observat schimbări în morfologia cromozomilor.

Cromozomii oligoteni (cu un grad de politenie mai scăzut) apar sub diverse forme: de panglică, formă șerpuitoare ș.a.

Cromozomii uriași maturi sunt cel mai adesea corpusculi cilindrici cu o structură *„cable-like"*. Datorită forțelor de torsiune care pot proveni din modificările structurale, secțiunea transversală prin acești cromozomi are formă de seceră în acest stadiu.

Mecanismele modificărilor structurale din cromozomii politeni nu sunt cunoscute. Se speculează că histonele sau modificările lor sunt implicate in schimbările de structură ale cromatinei.

Holmgreen (1976) a găsit diferențe semnificative în continutul histonic la larvele și adulții de la trei specii de *Drosophila*. Cele mai semnificative diferențe au fost cele ale histonelor bogate în Arg: s-au găsit cantități mari de histonă H_4 în larve și H_3 în adulți. Cum aceste diferențe nu au putut fi atribuite cantității diferite de heterocromatină, ele au fost puse în legătură cu evoluția politeniei (Nagl, 1978).

Benzile sunt reprezentate de spiralizări locale ale cromatidelor, în timp ce în interbenzi fibra cromatinică este extinsă. Aceste spiralizări reprezintă cromomere a căror vizibilitate depinde de gradul de condensare al cromatidelor. Deci, benzile reprezintă cromomere asociate intim, aparținând multiplelor cromatide dispuse la același nivel. Fiecare bandă este ca un disc care se întinde în toată grosimea brațului, fiind alcătuit din cromomere strâns împachetate. Structura cromomerică a cromozomilor politeni este vizibilă permanent deoarece acest tip de cromozomi nu parcurg ciclul de condensare — decondensare și se găsesc într-o interfază permanent extinsă. Ei nu parcurg mitoza.

Benzile care corespund cromomerelor prezintă o concentrare a masei cromatice mult mai mare decât în interbenzi (aproximativ de 10 ori mai mare). De asemenea, s-a constatat (la microscopul electronic) că densitatea între diversele benzi, diferă considerabil.

Modelele de benzi sunt înalt reproductibile și caracteristice pentru o anumită specie.

La *Drosophila melanogaster* (2n=8), în urma împerecherii somatice și a fuziunii de centromeri, rezultă o suprastructură cromatică — cromozomul uriaș, cu cinci brațe lungi și unul foarte scurt. Unul din aceste brațe a fost desemnat X, corespunzând cromozomilor X. Din cromozomii X de la femelă se formează un singur braț, deoarece ei prezintă un centromer apical care, participând la formarea cromocentrului, lasă un singur braț cromozomal liber. Tot un braț X apare și la cromozomul uriaș al larvelor de sex mascul. Din perechile II și III de cromozomi obișnuiți vor rezulta 4 brațe (cele mai lungi) ale cromozomului uriaș, deoarece

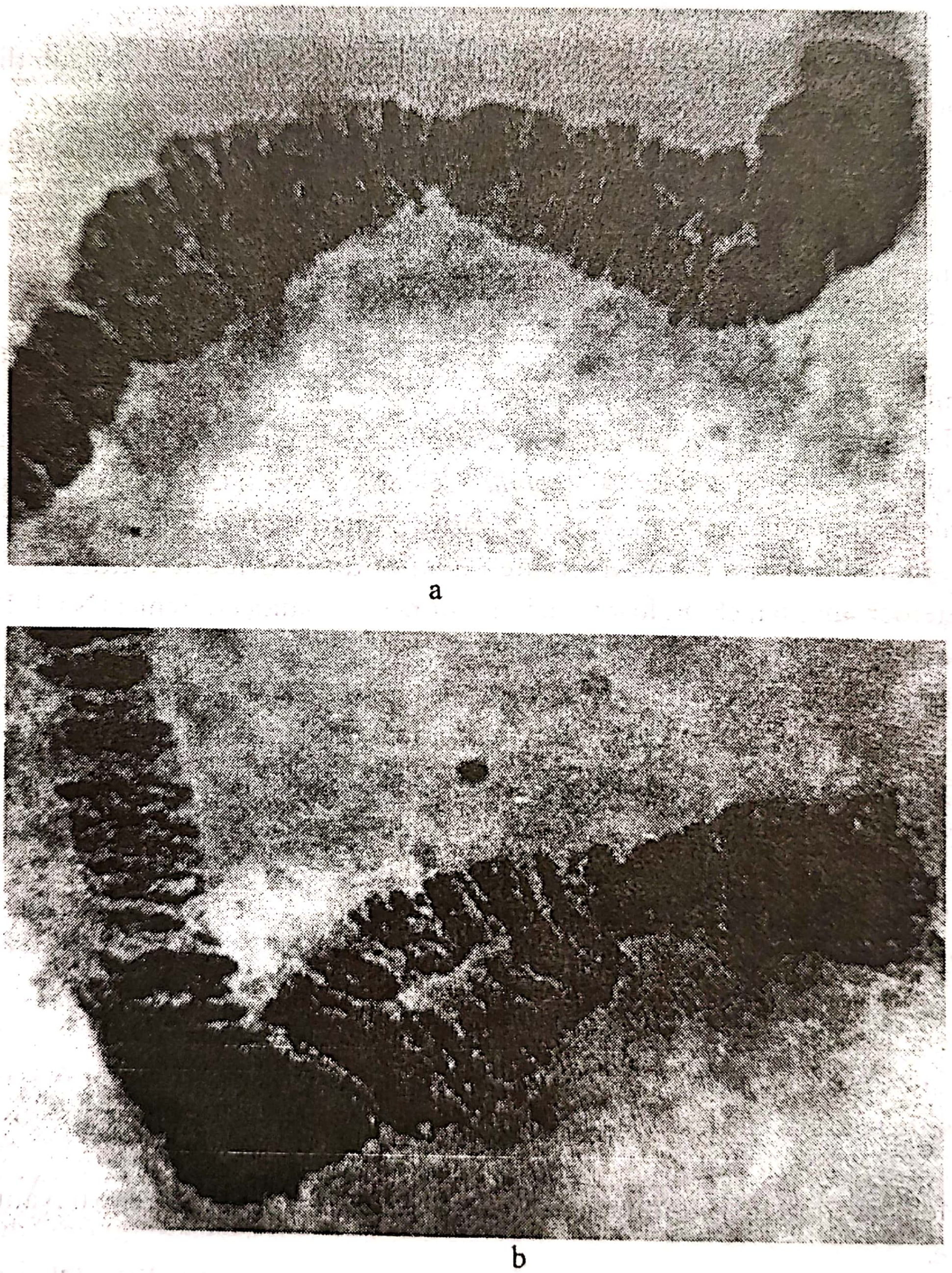


Fig. 8 — a, b Cromozomi politeni la *Chironomus plumosus*. Se observă prezența buclelor de inversie (original).

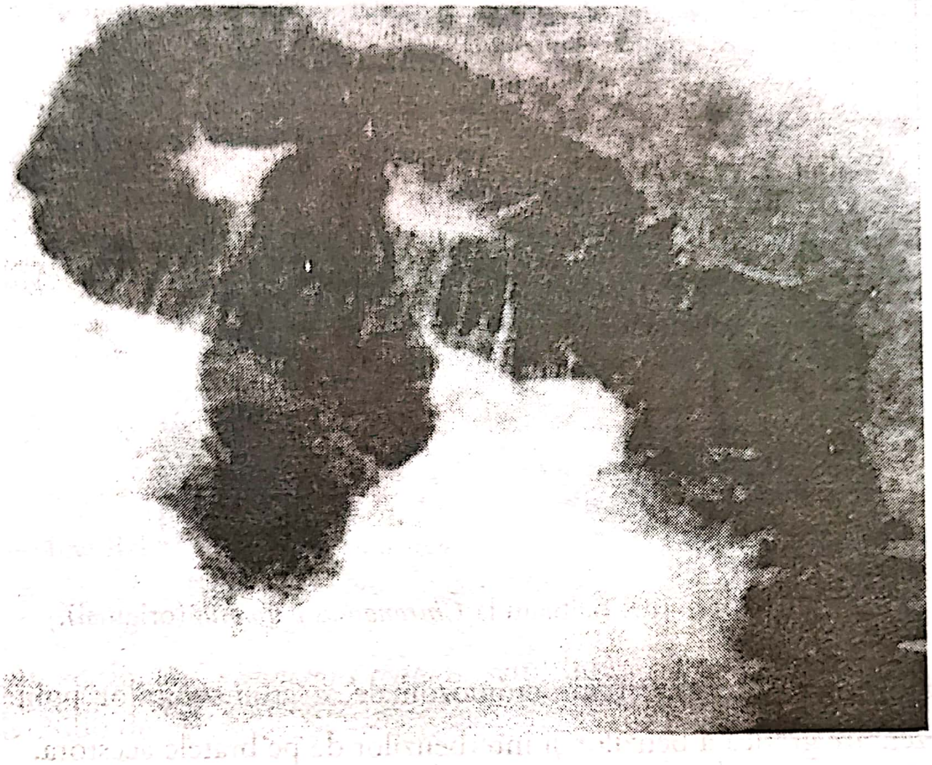


Fig. 8 — Rearanjament cromozomial cu translocație la *Chironomus plumosus* (original).

acești cromozomi au centromeri cu poziție mediană sau submediană și care, prin unire în cromocentru, vor lăsa câte două brațe libere ce vor deveni 4 brațe lungi ale cromozomului uriaș. Ele au fost desemnate 2R și 2L, respectiv 3R și 3L de la poziția de dreapta (*right*) sau de stânga (*left*) pe care o au aceste brațe atunci când le privim dinspre cromocentru spre deschiderea lor.

Perechea a IV a de cromozomi dă în cadrul cromozomului uriaș un singur braț cromozomal, cel mai scurt, dar enorm față de lungimea cromozomului 4 mitotic.

Orice modificare în structura acestor cromozomi, care creează o oarecare neomologie (prin inversii și duplicații, de exemplu), este trădată la nivelul brațelor cromozomului uriaș prin apariția unor alterări ale împerecherii somatice, exprimate sub forma unor bucle. La nivelul acestor bucle cromozomii nu se mai pot împerechea, trădându-se astfel caracterul duplicat (împerecheat, sinapsat) al fiecărui braț cromozomal, cu excepția cromozomului X de la larvele mascule. Astfel, sistemul politen devine un excelent sistem de studiu al rearanjamentelor cromozomale. (fig. 8,9).

S-a descoperit că între poziția genelor pe cromozomii metafazici și distribuția benzilor în cromozomii politeni există o anumită corespondență. Aceasta a fost premiza de la care s-a pornit să se realizeze o **cartare citologică**, de localizare a

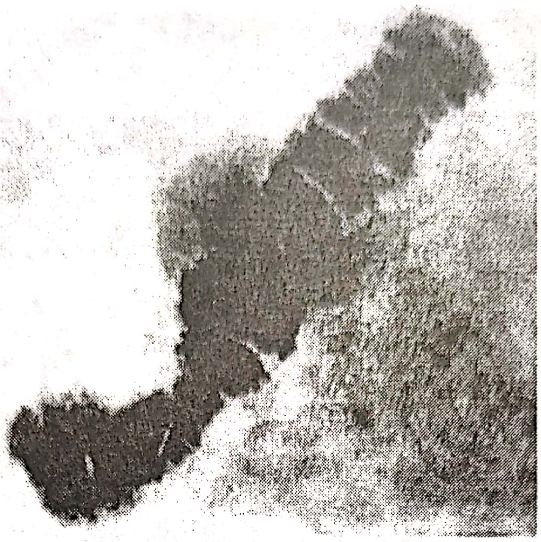


Fig. 10 — Inel Balbiani la *Chironomus plumosus* (original).

genelor cu ajutorul aberațiilor cromozomale, a cromozomilor politeni într-o reprezentare grafică a benzilor și interbenzilor de pe brațele acestora.

Estimarea numărului de benzi la *Drosophila melanogaster* a fost realizată prima dată de către Bridges (1935).

În urma câtorva revizuiri ale hărții citologice la *Drosophila melanogaster* , Bridges, (1942) a estimat numărul de benzi la 5027, confirmat mai târziu (Berendes, 1970) și prin studiul cromozomilor politeni la microscopul electronic.

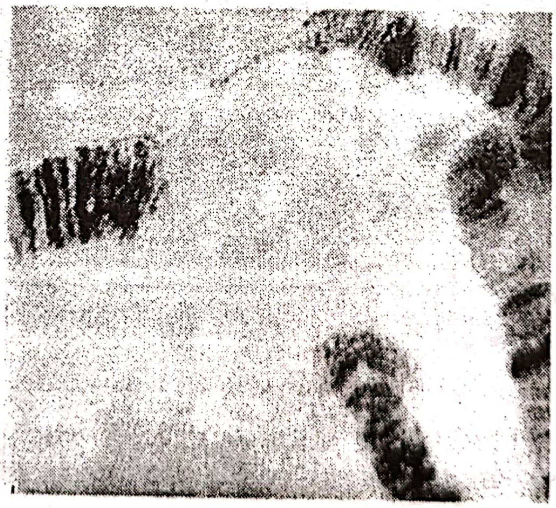


Fig. 11 — Organizarea supracromozomală evidentă la nivelul cromozomilor politeni, la *Chironomus plumosus* (original)

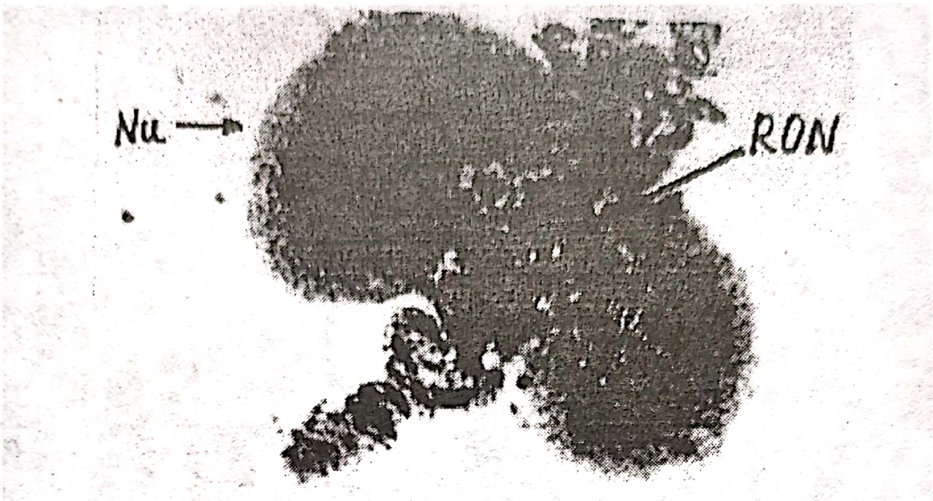


Fig. 12 — Inel Babliani la *Chironomus plumosus* (RON = Regiunea Organizator Nucleolară; Nu= nucleol) (original).

Prin comparație, la *Chironomus tentans*, setul întreg de cromozomi conține aproximativ 2000 de benzi.

Pe lângă modelul caracteristic de bandare, cromozomii politeni mai prezintă, ca aspecte specifice de fenotip cromozomal, regiuni de despiralizare ale cromomerelor (benzilor), ce apar ca niște funde și care au fost denumite **pufuri** sau **pufe**. La Chironomidae aceste pufuri au dimensiuni foarte mari și s-au numit **inele Balbiani**. (fig. 10, 12).

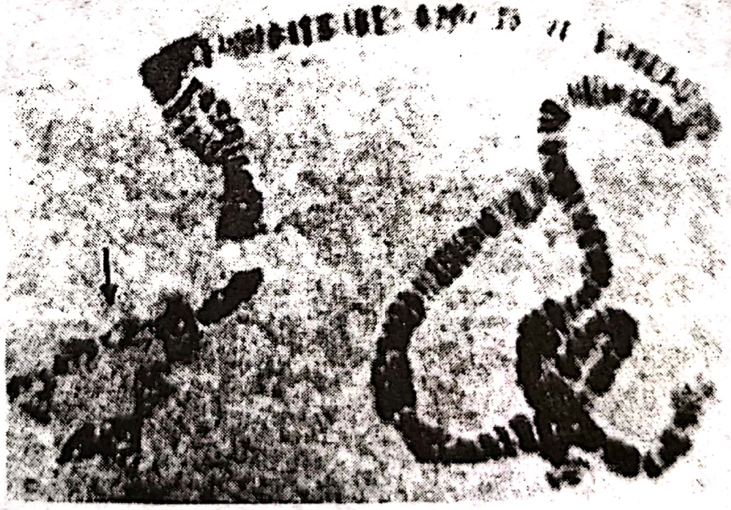


Fig. 13 — Cromozomul organizator nucleolar (IV) (săgeata) la *Chironomus plumosus* (original).

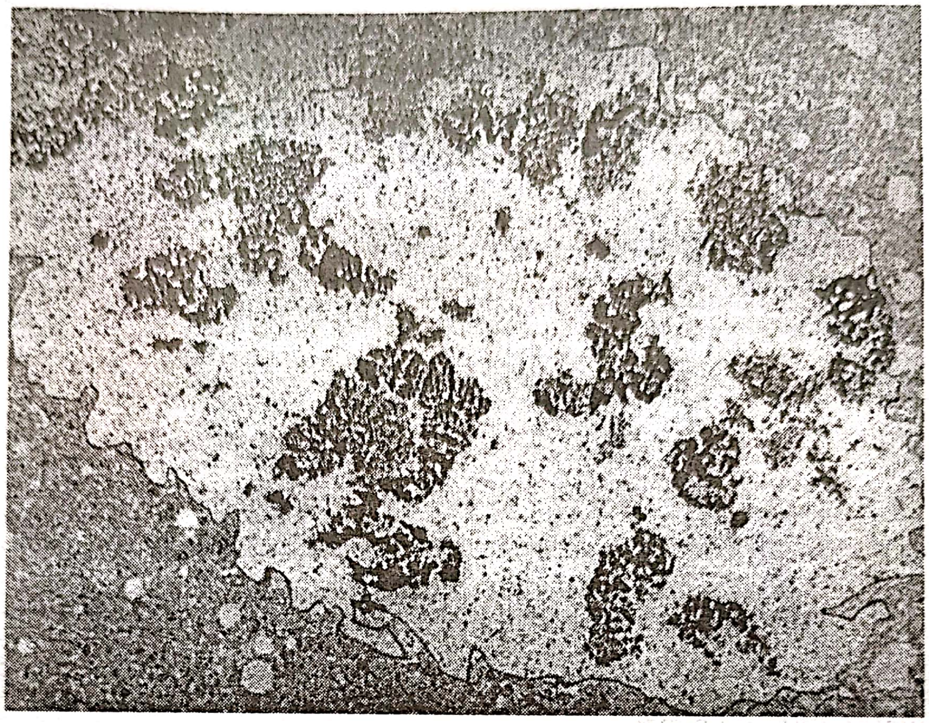


Fig. 14 — Nucleu cu profile de cromozomi politeni la *Rhagoletis cerasi* (X 3.223) (original).

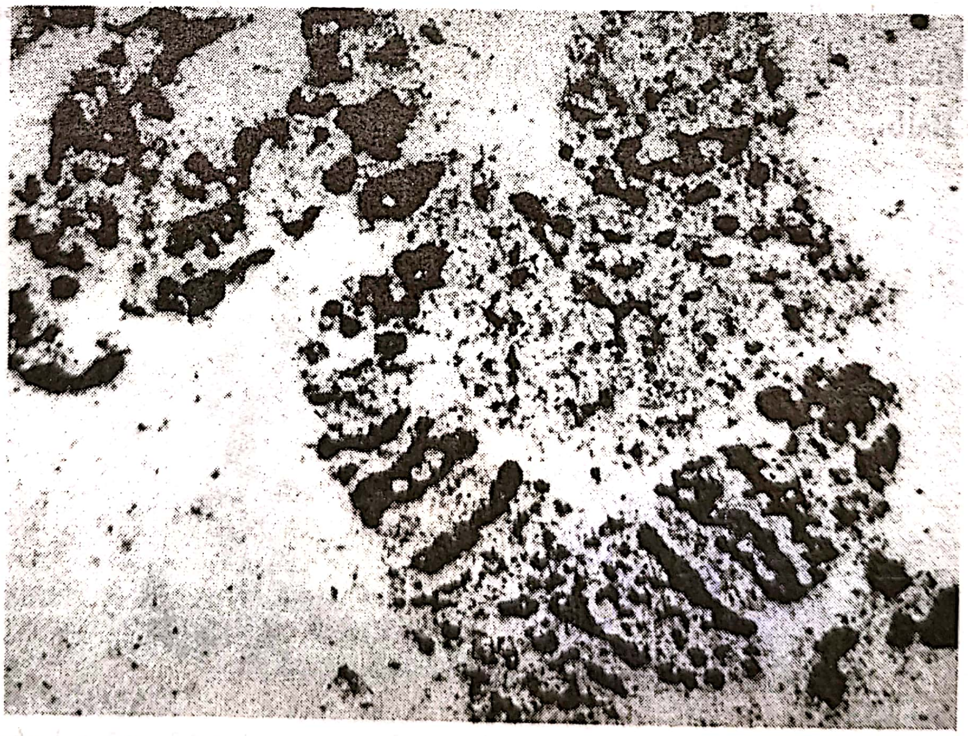


Fig. 15 — Cromozom politen la *Rhagoletis cerasi* (X 11.363) (original).

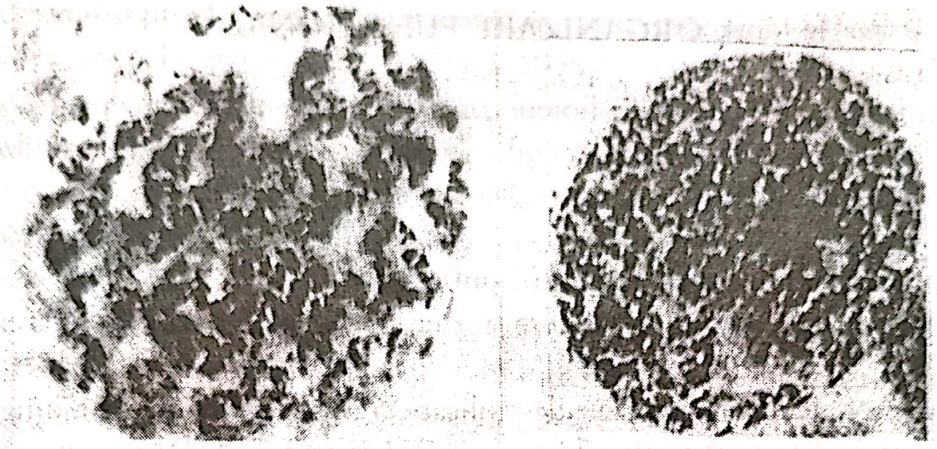


Fig. 16 — Nuclei politeni la *Corethra sp.* (original).

Aceste formațiuni reprezintă regiuni de intensă activitate a cromozomului, la nivelul cărora are loc transcrierea genică.

Pufele se pot forma la nivelul unei singure benzi sau se pot extinde la nivelul benzilor adiacente.

Există pufe ARN, cele mai multe, și pufe ADN la nivelul cărora, pe lângă sinteză de ARN, poate avea loc și o sinteză adițională de ADN, chiar în timpul pufării.

Puse cap la cap, brațele cromozomului uriaș de la *Drosophila melanogaster* măsoară circa 1180 μm, fiind de 157 de ori mai lungi decât lungimea celor 4 cromozomi neomologi din complementul cromozomal normal al celulei somatice (7,5 μm) din care rezultă cromozomul uriaș prin politenizare.

Fiecare braț cromozomal are un diametru de aproximativ 5 μm.

La nivelul structurii politenice nu mai este posibilă atingerea gradului de condensare a fibrei de cromatină pe care îl ating cromatidele cromozomilor mitotici. Astfel, cromatidele, la nivelul brațelor cromozomului uriaș, rămân într-un anumit grad de despiralizare și lungimea lor aparentă este mai mare.

La *Chironomus* și *Anopheles* a fost observată tendința brațelor cromozomale politene de a fuziona la nivelul telomerelor, determinând formarea unei structuri supracromozomale închise. (fig. 11)

S-a dat o interpretare rolului acestor structuri supracromozomale închise și anume, aceea că, la nivelul acestora, replicarea s-ar realiza cu o eficiență mai mare.

Telomerele sunt heterocromatice la cele mai multe diptere. Ele sunt alcătuite din α-heterocromatină tipică și sunt atașate la anvelopa nucleară.

4. ORGANIZARE FUNCȚIONALĂ

Cromozomii politeni de la diptere constituie excelente sisteme pentru studiul aspectelor funcționale ale cromozomului, cum ar fi rearanjamentele cromozomale, transcrierea genetică, organizarea nucleolară și amplificarea genică.

Replicarea ADN în cromozomii politeni

Ciclul de replicare al ADN în cromozomii politeni constă în trei faze: G_1, S și G_2.

Lungimea ciclurilor succesive de replicare crește exponențial de-a lungul stadiului larvar și direct proporțional cu conținutul crescut de ADN al cromozomilor. De asemenea, faza S este mai lungă în ultimele stadii de politenizare.

Studiul replicării cromozomilor politenici s-a făcut prin metoda autoradiografică.

Prin marcarea la interval de 6 ore a larvelor de *Chironomus* cu timidină ^{14}C și respectiv, timidină ^{3}H, s-a demonstrat că cele mai multe benzi ale cromozomului politenic au fost marcate cu timidină ^{14}C și foarte puține cu timidină ^{3}H. Deci, replicarea are loc în cea mai mare parte în faza S timpurie, iar acest mod de replicare s-a numit **replicare continuă.**

În câteva benzi are loc replicarea în faza S târzie și mai mult, unele benzi își termină replicarea înaintea altora, model care poartă numele de **replicare discontinuă.**

Modelul discontinuu este explicat prin aceea că benzile mai mari au nevoie de mai mult timp pentru replicare.

Termenii de continuu și discontinuu se referă la continuitatea marcării de-a lungul cromozomilor politenici, nu la continuitatea sintezei în timp, într-un anumit loc pe cromozomi.

Aceste experiențe au dus la ipoteza că benzile sunt unități de replicare și că toate benzile inițiază replicarea la începutul fazei S.

Alte studii de autoradiografie au arătat că benzile nu inițiază în același timp replicarea, ci unele în faza S timpurie, iar altele în faza S târzie.

Regiunile care se replică mai devreme sunt în special pufele și interbenzile, ceea ce înseamnă că inițierea replicării are loc mai rapid în cromatina decondensată.

Studiile asupra replicării ADN în cromozomii glandelor salivare de diptere au indicat existența unor unități de replicare independente, denumite repliconi.

Replicarea ADN începe în interbenzi, pufe și în anumite „benzi eucromatice“ și se termină înainte de sfârșitul fazei S. Benzile mai groase în care ADN este strâns împachetat își încep replicarea mai târziu, prezintă o rată mai scăzută de replicare și se termină la sfârșitul fazei S a ciclului celular.

Astfel, a fost propus un model de organizare a cromozomilor giganți în unități replicative, model sugerat de Sorsa (Nagl, 1978).

Acest tip de replicare discontinuă este expresia structurii multirepliconice a ADN de la eucariote și, independenței acestor repliconi. Numărul repliconilor este aproximativ egal cu cel al cromomerelor.

În cromozomii glandelor salivare de la *Drosophila melanovgaster* au fost observați 5029 repliconi, cu o lungime între 1μm și 200 μm.

Numărul repliconilor nu este constant în timpul dezvoltării organismului și se poate schimba paralel cu numărul cromomerelor. De exemplu, în culturile de celule diploide de *Drosophila melanogaster*, un replicon cuprinde 7 cromomere (Ananiev, 1977).

Dimensiunea repliconilor diferă în funcție de specie. În cromozomii politeni de la *Drosophila hydei* au fost identificați aproximativ 2000 de repliconi, cu o lungime de 20μm , iar la *Rhynchosciara angele*, aproximativ 1000 de repliconi de circa 65 μm lungime.

În cromozomii politeni există și regiuni specifice care nu urmează modelul general: regiuni cu subreplicare și regiuni cu replicare în exces sau suprareplicare. Acesta este un model de **replicare diferențiată a ADN**.

Suprareplicarea a fost analizată în detaliu la diferite specii de diptere (fam. Sciaridae). La aceste specii, în ultimele stadii larvare, unele benzi ale cromozomilor politeni parcurg cicluri de extrareplicare. Aceste benzi au fost denumite „pufe ADN". Cantitatea de ADN în aceste benzi crește în proporție geometrică, fenomen care este sub control hormonal. Fenomenul de suprareplicare este similar cu amplificarea genelor pentru ARNr în ovocitele amfibienilor, cu deosebirea că, de regulă, ADN în exces, din cromozomii politeni rămâne în cromozom.

Subreplicarea este un fenomen caracteristic regiunii heterocromatice care alcătuiește cromocentrul.

Heterocromatina centromerică este compusă din două tipuri de heterocromatină: α și β. Hetrocromatina α nu crește în timpul procesului de politenizare, fiind o heterocromatină subreplicată. Are loc o întârziere a replicării, încât se produc doar câteva cicluri de replicare înainte de completarea politenizării.

Dovezile citologice ale existenței acestui fenomen sunt dublate de cele biochimice. Astfel, experiențele de hibridizare „in situ" arată că ARN complementar cu ADN satelit se găsește în cromocentru.

Mecanismul existenței unor cantități inegale de ADN în cromocentru față de restul cromozomilor politenici presupune ori subreplicarea secvențelor de ADN satelit, ori replicarea normală în toate regiunile cromozomilor, urmată de degradarea selectivă a ADN în regiuni specifice cum este cromocentrul.

Indiferent care din aceste două mecanisme este cel real, existența unor regiuni cu cantități de ADN în exces sau sub limită pune problema conformației structurale a cromatidelor la capete. De exemplu, dacă regiunile eucromatice ale cromozomilor politeni au suferit 10 cicluri de replicare, ei vor conține 1014 cromatide. Regiunile heterocromatice care au suferit numai câteva cicluri vor conține 8-16 cromatide separate. Deoarece continuitatea cromozomului trebuie menținută, în ciuda acestor discrepanțe în ceea ce privește numărul de cromatide, în regiunile de întâlnire dintre eucromatină și heterocromatină se formează mănunchiuri de cromatide, care reprezintă furci de replicare blocate. Probabil, același mecanism acționează la capetele pufelor ADN (unde se realizează) o amplificare de ADN și ale genelor ribozomale.

Părțile eucromatice ale cromatidelor se replică sincron, ceea ce duce la o creștere în proporție geometrică a conținutului de ADN, atingând în final un nivel de politenie ce variază de la 1024, în glandele salivare de la *Drosophila melanogaster*, la 16.384, la *Chironomus* și 32.768, la *Rhynchosciara*.

5. TRANSCRIPȚIA ÎN CROMOZOMII POLITENI

În unele stadii de dezvoltare larvară, anumite benzi devin umflate și difuze formând pufe.

Există pufe ADN, la nivelul cărora are loc o amplificare locală a genelor sau a segmentului de ADN. Aceste pufe de ADN sunt deci, situsuri de amplificare genică, fiind implicate în diferențiere și dezvoltare.

O pufă ocupă de obicei, o bandă și o interbendă vecină și se formează prin decondensarea cromomerelor.

Pufele reprezintă, de fapt, genele în timpul activității de transcripție, modelul lor schimbându-se în cursul dezvoltării larvare normale, într-un țesut anume, în funcție de proteinele necesare fiecărui stadiu de dezvoltare. Astfel, într-un anumit moment, numai anumite gene intră în stare de pufare.

În glandele salivare de la larvele *Chironomidelor*, cromozomii politeni prezintă pufe de dimensiuni foarte mari, numite inele Balbiani.

La *Aricotopus lucidus*, doi lobi ai glandelor salivare secretă proteine salivare ce conțin hidroxiprolină, a cărei sinteză este corelată cu prezența a două inele Balbiani. Prin tratarea cu giberelină, se inhibă specific sinteza ARN și unul dintre inelele Balbiani, inhibare care este acompaniată de absența proteinelor ce conțin hidroxiprolină. Se poate spune deci că, există o corelație directă între un singur inel Balbiani și sinteza proteinelor salivare care conțin prolină.

În timpul formării pufelor se observă o mare creștere a cantității de ARN și proteine.

ARN din glandele salivare poate fi marcat cu uridină tritiată prin injectarea izotopilor în larve sau prin incubarea glandelor izolate, într-un mediu ce conține precursorii pentru tratament. După numai 5 minute, radioactivitatea poate fi detectată în nucleii celulelor prin autoradiografie. Grain-urile sunt strict concentrate în pufe și nucleoli și incorporarea lor este limitată la sinteza ARN în aceste situsuri.

Wieslender și col. (1975) au analizat hibridizarea ARN total nuclear la cromozomii politeni de la *Chironomus tentans.* Hibrizii au fost preferential formați în cinci regiuni distincte care conțin clustere — secvențe de ADN repetitive. Acestea sunt: două regiuni organizator nucleolare, inelele Balbiani 1 și 2 și genele pentru ARNr 5S, din regiunea 2A a cromozomului II care cuprind împreună aproximativ 70% din numărul total al grain-urilor pe complement. Grain-urile rămase au fost distribuite difuz pe cromozom.

Deoarece cantitatea de proteine histonice nu se schimbă mult în timpul ciclului celular, creșterea cantității de proteine totale se face pe seama proteinelor non-histonice, iar creșterea ARN in pufe se face pe seama ARN nou transcris în aceste pufe.

Creșterea cantității de proteine non-histonice ajută la condensarea cromomerelor în vederea transcrierii.

ARN nou sintetizat formează complexe nucleoproteinice împreună cu proteinele non-histonice, în special.

Atât pufele cât și inelele Balbiani sunt locuri în care ADN funcționează ca matriță pentru sinteza ARN, fapt evidențiat prin incorporarea uridinei tritiate. Unele din respectivele structuri sunt angajate în sinteza ARNm ce transcrie mesajul care va dirija sinteza unui produs proteinic necesar metamorfozei insectei, pe când altele sunt angajate în sinteza de ARNr funcționând ca organizatori nucleolari (la nivelul NOR găsindu-se genele pentru fracțiile de ARNr 18S și 28S).

S-a pus întrebarea dacă genele care codifică sunt localizate în interiorul cromomerelor sau între cromomere. Dovezile genetice și biochimice au dus la concluzia că genele sunt situate în interiorul benzilor, deși ARN polimeraza este localizată cu precădere în interbenzi. Un răspuns speculativ la această intrebare ar fi că genele esențiale ale genomului de bază (*house-keeping genome*), exprimate în toate celulele organismului, sunt situate în interbenzi (ce formează pufe mai mici), iar genele specifice unui anumit stadiu de dezvoltare a unui țesut sunt situate în cromomere.

Sub acțiunea șocurilor termice sau a hormonilor, la nivelul cromozomilor politeni se produc modificări ale modelului de pufare. De exemplu, formarea pufelor ADN poate fi indusă în cromozomii giganți de la *Sciara*, de către ecdyson (hormon de creștere).

Se pare că un rol important în inducerea pufelor, deci a activității de transcriere, îl joacă anumite proteine cromozomale non-histonice. Mărirea cantității de proteine non-histonice este stimulată de tratamentul cu ecdyson sau de expunerea la temperaturi ridicate.

Încă din 1952, pufele au fost corelate cu activitatea genelor.

Existența modelelor de pufare specifice unui țesut sau specifice unui anumit stadiu de dezvoltare a indicat faptul că celula este capabilă să controleze funcțiile metabolice prin controlul intrării în activitate a genelor.

La *Chironomus tentans*, 300 din cele 2000 de benzi sunt pufate într-un anumit țesut, astfel încât, doar 15% din genom este transcris. Berendes a estimat că doar 5% din pufele de la *Drosophila hydei* sunt specifice unui anumit țesut, restul sunt active în menținerea funcțiilor de întreținere ale celulei (Nagl, 1978). Acesta ar fi un argument în plus pentru ideea că genele metabolismului bazal sunt localizate în interbenzi.

Analiza procesului de transcripție s-a făcut la *Chironomus tentans* la nivelul inelului Balbiani 2 (BR 2) din cromozomul IV. Acesta este un puf gigant, atipic, format dintr-o bandă subțire care conține doar 10.000-20.000 perechi de baze per cromatidă. Pe baza genelor repetitive din această regiune este transcris ARN 75S care, extras și purificat, hibridizează „in situ“ cu regiunea inelului Balbiani 2 din cromozomul IV. ARN 75S este transferat în citoplasmă, fără să sufere procesul de maturare. Totuși, în cele mai multe pufe și în buclele cromozomilor lampbrush numai o mică porțiune din ADN-ul cromomerei este transcris, maturat și trecut în citoplasmă, iar cea mai mare parte a ADNnh (nuclear heterogen) nu părăsește niciodată nucleul, ci este degradat în interiorul acestuia.

Produșii caracteristici pufelor sunt particule RNP, care pot fi observate cu ajutorul microscopului electronic.

Produșii de transcriere apar sub forma unor particule electronodense cu diametru cuprins între 350 și 450 Å (Nagl, 1978).

În celulele glandelor salivare de la *Drosophila hydei*, un puf poate fi indus prin injectarea vitaminei B6. Produsul acestui puf apare ca un complex RNP gigant cu o morfologie specifică. Acest complex, cu un diametru mai mare de 4000 Å, constă dintr-un miez și o regiune corticală, formând o ghirlandă de particule mici (cu un diametru de aproximativ 300 Å). Analizele citochimice au arătat că miezul nu conține ARN în timp ce cortexul conține.

Modelele de pufe specifice stadiului de dezvoltare și țesutului au dus la sugestia că cromomera (banda) este unitatea de transcripție și că formarea pufelor este o expresie a activității genice.

6. CONTROLUL POLITENIEI

Ca și în cazul endopoliploidiei, formarea cromozomilor politeni este influențată de factori de mediu și nutriționali, atât la plante, cât și la animale.

Barigozzi și Simenza au observat că dacă larvele de *Aphiochaeta xanthia* erau hrănite cu ficat (deci hrană bogată in aminoacizi), cromozomii politeni din glandele salivare aveau o structură compactă. Dacă hrana era săracă în aminoacizi, nucleii poliploizi deveneau fibrilari (reticulari) (Nagl, 1978)

Datele disponibile până în prezent nu sunt suficiente pentru a înțelege cum un factor oarecare poate stimula sau inhiba compactarea endocromozomilor. Totuși, a fost înaintată o ipoteză interesantă de către Mayfield și Ellison (1975). Acești autori consideră că proteinele non-histonice se leagă la anumite secvențe de ADN și în special la cromomerele de la nivelul benzilor. Această clasă de proteine lipsește în timpul pufării și în nucleii reticulați. Proteinele non-histonice ar putea fi specifice pentru heterocromatină care este subreplicată în nucleii politeni.

Holmgreen și colaboratorii (1976) au găsit modificări semnificative în cantitatea și compoziția histonelor între larvele și adulții de la trei specii de *Drosophila* (Nagl, 1978).

Factorii exogeni, cum ar fi hormonii, joacă un rol important în controlul dezvoltării celulei pe parcursul ciclului celular.

Gruzdev și Belaya (1968) au realizat experimente din care a reieșit rolul punților disulfurice în formarea cromozomilor politeni, și alte asemenea experimente au sugerat implicarea ionilor metalici bivalenți în politenizare (Nagl, 1978).

De asemenea, factorii de mediu influentează procesul de politenizare.

Cassagnau (1974), investigând cromozomii politeni din glandele salivare de la *Neanura monticola*, a observat că morfologia cromozomului politen X variază la diferențele factorilor ecologici din Pirineii Centrali.

La o populație de la șes, cromozomul X are un aspect granular neclar, în timp ce la populațiile subalpine, cromozomul X are în compoziția sa o cantitate mare de α- heterocromatină.

Cassagnau a identificat cinci tipuri structurale diferite ale cromozomului X, a căror frecvență variază cu habitatul.

O observație similară a fost făcută de Wolf și Sokoloff (1973), găsind că brațul politen X de la *Piryne cincta* prezintă două blocuri mari de α- heterocromatină la populațiile colectate din zonele alpine, în timp ce la populația berlineză aceasta lipsește. Probabil această α- heterocromatină ajută insectele să se adapteze la condiții de mediu mai stringente (Nagl, 1978).

7. AMPLIFICAREA GENICĂ LA NIVELUL CROMOZOMILOR POLITENI ȘI ROLUL JUCAT DE CĂTRE ACEST MECANISM ÎN DIFERENȚIEREA CELULARĂ.

Existența, funcționarea eficientă și propagarea organismelor pluricelulare depind de interacțiunea coordonată a celulelor lor specializate pentru îndeplinirea diferitelor funcții.

Particularitățile biochimice și morfologice ce caracterizează diferitele tipuri de celule ale unui organism multicelular sunt rezultatul diferențierii celulare.

Diferențierea celulară este consecința expresiei genice diferențiate.

În cromozomii celulelor eucariote există un adevărat program genetic care comandă diferențierea celulară, formarea diverselor țesuturi și organe în timp și spațiu.

Problema centrală a diferențierii constă în reglarea diferențiată a activității genice în cursul embriogenezei și dezvoltării.

Britten și Davidson (1969, 1973, 1977) au stabilit că schimbările în starea de diferențiere sunt adesea mediate de semnale externe, precum hormoni și factori de mediu.

O anumită genă poate fi activată, pe de o parte, de diferite semnale, iar pe de altă parte, o stare dată a diferențierii implică activitatea integrată a unui număr mare de gene nelincate.

Modelul Britten — Davidson sugerează existența de baterii de gene suprapuse construite din *gene structurale (producătoare)*, fiecare legată de *o genă receptoare* sau mai probabil, de gene receptoare, repetitive, care conțin situsuri de recunoaștere pentru ARN-uri activatoare. Aceste molecule de ARN sunt transcrise de pe *gene integratoare*, care prin activitatea lor condiționează coordonarea activității *genelor receptoare*. Un set de gene integratoare lincate este activat de un produs difuzibil al unei *gene senzor*, care este stimulată de o situație specifică de mediu sau de hormon. Rezultatul este activarea concertantă a unui număr mare de gene producătoare (structurale).

Modelul dă o explicație activării concertante a uneia sau a mai multor baterii de gene structurale, determinând astfel existența diferitelor stări de diferențiere.

Modelul Britten — Davidson are ca sprijin experimental cantitatea enormă de ADN nuclear și în special, de ADN repetitiv, la eucariote, ADN care nu codifică polipeptide sau ARN stabil, efectul cunoscut al hormonilor sau altor mediatori chimici asupra activității genice, și evoluția unor specii cu organizare cu totul diferită, fără schimbări semnificative, la nivelul genelor.

Prin acest model este explicată semnificația biologică a amplificării secvențelor repetitive, necodificatoare de ADN cum sunt ADN satelit, precum și alte tipuri de ADN ale heterocromatinei. Astfel, secvențele adiacente genei sunt de mare importanță pentru reglarea activității genice. Acestea acționează ca secvențe integratoare care coordonează activitatea diferitelor gene care acționează împreună în diferite stadii ale diferențierii.

Replicarea diferențiată are rol important în variația cantității de ADN.

Cromozomii politeni, structuri ce rezultă în urma endociclurilor, prezintă zone cu subreplicare în exces sau subreplicare.

Exemplul cel mai cunoscut de replicare diferențiată îl constituie *pufele ADN* din glandele salivare ale insectelor aparținând familiei Sciaridae. La nivelul acestor pufe au loc mai multe runde de replicare a ADN. Ulterior, la nivelul acestora are loc transcrierea.

Transcrierea diferențiată a genelor în cursul dezvoltării ontogenetice contribuie, de asemenea, la procesul de citodifernțiere, existând o anumită ordine de apariție a pufelor în cromozomii politeni.

Pufele și inelele Balbiani sunt legate de o intensă activitate ribonucleoproteinică.

O trăsătură caracteristică locilor cu activitate intensă este reprezentată de apariția *micronucleolilor*. Prin endoreduplicare are loc o creștere mare a numărului de nucleoli.

S-a constatat că la diptere, în special la Sciaridae, micronucleolii sunt produși de-a lungul intregului cromozom politen. Aceasta ar însemnă că cistronii ribozomali sunt distribuiți și în alte regiuni ale cromozomului, nu numai la nivelul regiunii organizator nucleolare. Pardue și Gall (1972) au observat că la *Rhynchosciara*, micronucleolii provin și de la nivelul situsurilor heterocromatice (Nagl, 1978).

Observațiile de microscopie electronică, la nivelul structurii nucleului și citoplasmei, au indicat o intensă activitate a nucleilor politeni din celulele gigante.

Micronucleolii sunt transferați din nucleu în citoplasmă cu ajutorul numeroaselor invaginări ale membranei nucleare.

Observațiile electronomicroscopice au indicat că acești micronucleoli sunt localizați în regiunile lobate ale nucleului și apoi sunt transferați în citoplasmă. Anvelopa nucleară este întreruptă în aceste regiuni și micronucleolii sunt eliberați.

Cromozomii politeni sunt structuri prin excelența funcționale. Ei asigură sinteza unor produși necesari într-o cantitate foarte mare, într-un timp foarte scurt, condiționând transformarea larvei în pupă. După sinteza acestor produși, celulele care au fost angajate în asemenea sinteze suferă autoliză. Celulele glandelor salivare ale adultului (care posedă cromozomi obișnuiți) nu provin din celulele glandelor salivare, ci din alte celule în timpul proceselor de histoliză și histogeneză, din stadiul nimfal. După ce au asigurat o sinteză intensă, cromozomi politeni se dezintegrează, ei nefiind structuri implicate în transmiterea informației ereditare în descendență. Ei nu sunt desemnați să asigure continuitatea eredității, ci sunt prin excelență structuri funcționale, în care ADN își manifestă în exclusivitate funcția heterocatalitică de dirijare a sintezei unor proteine specifice. Numai că aceste proteine sunt cerute celulei într-o cantitate mare și într-un timp foarte scurt. Singura soluție pentru îndeplinirea acestor cerințe este adoptarea **POLITENIEI**.

8. POLITENIZAREA ÎN CONDIȚII PATOLOGICE

Endopoliploidizarea, politenizarea și restituția nucleară sunt procese spontane, frecvent întâlnite în timpul dezvoltării organismelor. Dar cursul normal al țesutului poate fi alterat de infecțiile cu paraziți, mutații sau de transplante.

Matuszewski (1964) a descris prezența nucleilor giganți în celulele corpului de *Dasyneura urticae* parazitată de larve de himenoptere. Acești nuclei giganți sunt organizați în sinciții și prezintă un număr poliploid de cromozomi politeni. O trăsătură caracteristică în această situație este mărimea gigantă a cromozomilor, determinând astfel o creștere in conținutul de ADN, aceasta putând fi acompaniată de fenomenul de pufare și pierderea structurii cromozomale.

În cazul infecției cu microsporidii (*Thelohania* sau *Octosporea*) la *Sciara ocellaris* s-a observat o intensă politenizare, alterarea pufelor ADN și ARN, dispersie, desinapsări complete sau parțiale și predispoziția celulelor la liză (aceste caracteristici fiind observate în diverse țesuturi cum ar fi: glande salivare, perete intestinal, mușchi, perete traheal și corpi grași).

Viața celulelor glandelor salivare poate fi prelungită prin transplantarea lor din larve în adulți.

Hadorn a constatat că 20% din nucleii celulelor glandelor salivare prelevate 72 de ore de la larve de *Drosophila melanogaster* și implantate pentru 3 săptămâni intr-un adult, prezintă un conținut nuclear în exces față de valorile maxime normale. O sinteză intensă de ADN a fost găsită de către Berendes și Holt în transplantele de nuclei din glandele salivare de la *Drosophila hydei* (Nagl, 1978).

Durata stadiului larvar la *Drosophila melanogaster* poate fi prelungită prin mutațiile recesive **tu-h** (*"tumorous head"*). În acest stadiu larvar prelungit are loc o extrareplicare a materialului genetic în nucleii celulelor glandelor salivare.

Politenizarea în conditii patologice atinge un nivel mult mai ridicat decât în condiții normale, astfel, conținutul în ADN poate ajunge la o valoare de 4096C.

Investigațiile nostre preliminare indică posibilitatea politenizării nucleilor limfocitelor din culturi de sânge periferic uman, în condiții de iradiere și tratament cu fitomenadionă (vitamina K)

CAPITOLUL XXIII

CROMOZOMII URIAȘI LA CILIATE

1. INTRODUCERE

Ciliatele sunt caracterizate de prezența în celule a două tipuri de nuclei. Macronucleul este „nucleul somatic", responsabil de aproape întreaga sinteză de ARN celular. În timpul reproducerii sexuate sau conjugării, el se resoarbe. Micronucleii diploizi reprezintă nucleii liniei germinale.

Balbiani a fost primul care a identificat cromozomii uriași la *Loxophyllum meleagris* și a comparat aceste structuri cu cromozomii uriași de la diptere, pe care îi identificase cu câțiva ani mai devreme. Conform desenelor sale (fig. 2), cromozomii urisași s-ar găsi la nivelul macronucleului. Reexaminările realizate de Ruthmann și Ammermann(1963), nu au relevat prezența acestora în macronucleu. Până în prezent, cromozomii uriași au fost întâlniți ca stadii tranziente în macronucleul exconjuganților.

Grasse (1952) a menționat prezența cromozomilor uriași la *Nyctotherus cordiformis* . Aceste observații au fost confirmate mai târziu de către Golikova (1964).

Cromozomii uriași la ciliate au fost evidențiați inițial la *Stylonychia* (Ammermann, 1965) (fig. 1), ulterior ei fiind evidențiați și la alte specii *Euplotes* și *Oxytricha*. Cromozomi uriași au fost observați și la exconjuganții de la *Chilodonella cucullulus*.

2. MORFOLOGIA CROMOZOMILOR URIAȘI AI CILIATELOR

La toate ciliatele care prezintă cromozomi uriași, stadiul în care aceștia sunt prezenți este urmat de un stadiu de eliminare a cromatinei. Această eliminare de material genetic a fost ulterior demonstrată prin studii spectrofotometrice.

Există numeroase diferențe între cromozomii uriași de la diferitele genuri și specii de ciliate. *N. cordiformis* are probabil o singură pereche de cromozomi sub

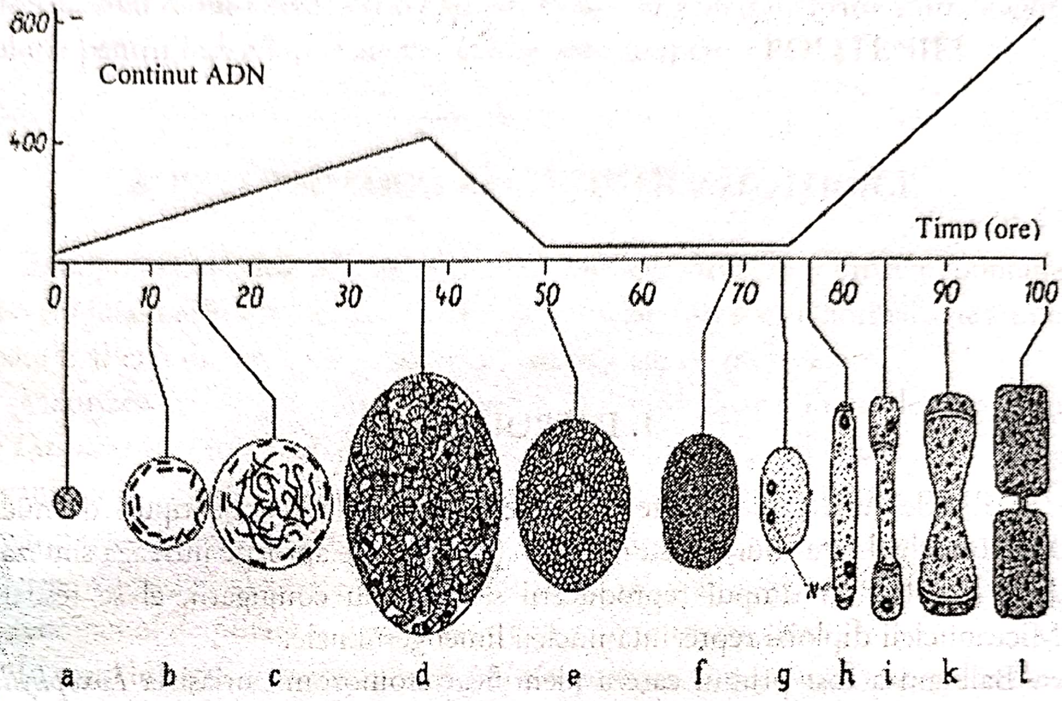


Fig. 1 — Evoluția macronucleului la ciliatul *Stylonychia lemnae* (după Ammermann și colab., 1974)

(a) după separarea celulelor exconjugate (0 h) macronucleul tânăr are conținutul în ADN corespunzător unui micronucleu diploid. Începe creșterea conținutului de ADN;
(b) cromozomii ușor condensați devin vizibili la periferia macronucleului;
(c) 20% dintre cromozomi suferă despiralizare și încep să evolueze în cromozomi uriași. Restul de 80% dintre cromozomii condensați sunt resorbiți (prima etapă de eliminare a cromatinei);
(d) conținutul de ADN atinge primul maxim și cromozomii uriași ating mărimea maximă în această fază;
(e), (f) cromozomii uriași sunt fragmentați, fragmentele cromozomale fiind incluse în vezicule separate. Conținutul de ADN scade puternic, mai mult de 90% din ADN fiind eliminat (a doua etapă de eliminare a cromatinei). Urmează o fază în care conținutul de ADN este scăzut;
(g) sfârșitul etapei precedente este marcat de apariția în protozoar a doi nucleoli;
(h)-(k) devine vizibilă replicarea benzilor, iar conținutul de ADN se multiplică de 5 ori, nucleul se lungește și crește numărul de nucleoli;
(l) este atins conținutul normal de ADN.

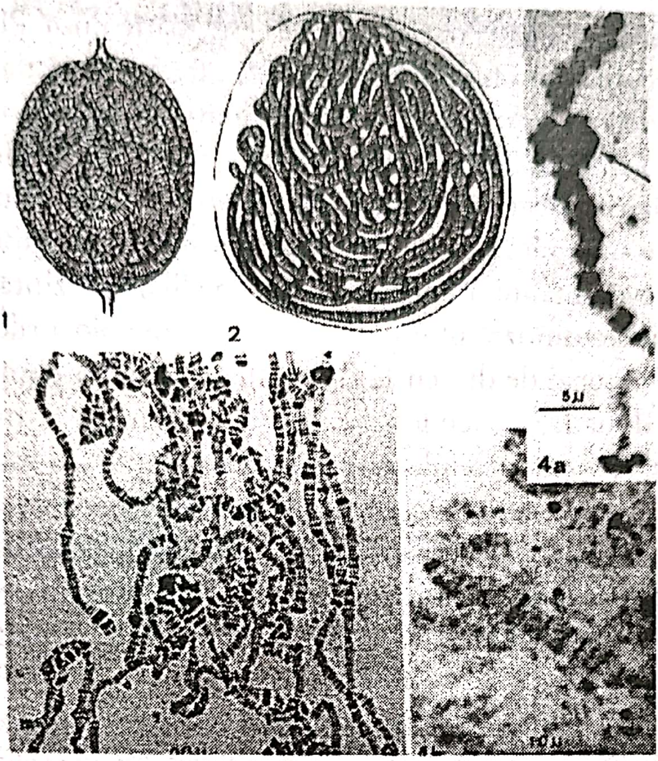


Fig. 8 — Cromozomii giganți la ciliate
1 – *Loxophyllum meleagris* (Balbiani, 1890)
2 – *Nyctotherus cordiformis* (Grassé, 1952)
3 – *Stylonychia lemnae* (Ammermann, 1965)
4 a, b – *Chilodonella cucullulus* (Radzikowski, 1979).

forma unui cromozom uriaș colectiv, în timp ce *S. lemnae* are aproximativ 70 de cromozomi uriași neîmperecheați (Ammermann, 1974) și *Oxytricha* are aproximativ 120 de cromozomi (Spear și Lauth, 1976).

La *S. lemnae* și *C. cucullulus* există benzi mari, heterocromatice care lipsesc la alte specii.

Numărul benzilor la *S. lemnae* și *Oxytricha* sp (10.000) sunt aproximativ egale cu cele de la diptere.

În contrast cu aceste asemănări, rezultatele observațiilor electronomicroscopice efectuate de Meyer și Lipps (1984), au evidențiat numeroase diferențe. Cromozomii politeni de la *Drosophila* sunt formați din cromomere înalt spiralizate care sunt separate de interbenzi (10 nm). Cromozomii uriași la *S. lemnae* prezintă cromomere care sunt agregate în bucle laterale de 30 nm, atașate la filamente axiale de 10 nm.

O altă diferență importantă între cromozomii uriași de la ciliate și cei de la diptere este activitatea lor diferită. Cromozomii uriași de la toate ciliatele nu prezintă sinteză ARN, sau dacă aceasta totuși există, ea este foarte mică. Pufele sintetizatoare de ARN și nucleolii sunt absenți În acest caz, care este funcția acestora?

Cercetările efectuate la toate ciliatele au arătat clar că în timpul dezvoltării macronucleului, genomul micronuclear este subiectul unor modificări severe. ADN cromozomal micronuclear este tăiat în fragmente de dimensiuni mari. Ulterior aceste fragmente sunt reunite. Se speculează ca funcția acestor cromozomi este legată de aceste evenimante. Replicarea ADN la ciliate prezintă două faze. Prima conduce la apariția cromozomilor politeni cu prezența blocurilor bogate în ADN și a numeroaselor benzi de dimensiuni mai mici. Ulterior eliminării cromatinei, are loc cea de a doua fază a replicării care este asemănătoare oricărei replicari ce are loc în cadrul diviziunii celulare. Prima fază a replicării este caracterizată de prezența supra- și/sau a subreplicării.

Cromozomii polteni sunt rezultatul unei replicării inegale, unele sectoare fiind extrareplicate, pe când altele sunt subreplicate. Procesul de degradare a cromozomilor uriași este departe de a fi pe deplin clar, fiind necesare numeroase alte investigații.

În ciuda structurii lor similare în microscopie optică, cromozomii politeni de la Ciliate și de la Diptere au funcții complet diferite.

CAPITOLUL XXIV

CROMOZOMII POLITENI LA PLANTE

1. INTRODUCERE

Dublarea cantității de ADN la nivelul nucleului interfazic este o condiție necesară desfășurării mitozei si, totdată, impune diviziunea. Când, în anumite condiții anormale (patologice) sau sub acțiunea unor agenți mutageni-clastogeni, ce alterează funcțiile celulare, replicarea cromozomilor nu este urmată de diviziunea nucleului și de diviziunea celulară, aceștia rămân în același nucleu, care își mărește în proporție geometrică cantitatea de ADN. Acest proces, prin care în cadrul ciclului cromozomal apar doar evenimente replicative, fiind omise evenimentele distributive, se numește ENDOCICLU, deoarece procesul se desfășoară într-un nucleu care își păstrează intactă membrana nucleară. In cazul în care cromozomii își păstrează morfologia tipică cromozomilor metafazici, un asemenea endociclu poartă numele de ENDOMITOZĂ, care duce la endopoliploidie. Endociclurile pot apare și în condițiile înțepăturii plantelor de către unele insecte, ceea ce conduce la formarea de gale sau alte malformații, ca și în cazul unor infecții virale sau cu micoplasme. De asemenea, unele endocicluri sunt legate de procese normale de citodiferențiere.

Dacă produșii de replicare (cromatidele) nu se separă, astfel că nu se individualizează cromozomi separați, are loc fenomenul de POLITENIE.

Atât politenia cât și endopoliploidia reprezintă consecința unei modificări în derularea unui ciclu celular normal(Geitler, 1937).

Stagnarea mitozei face posibilă sinteza continuă și crescută de ARN, și de aici rezultă o potențialitate mai mare pentru sinteza proteinelor din celulă (Bennet 1973, Clutter, 1974). Această proprietate este o caracteristică ce decurge din fenomenul de endopoliploidie.

Multe celule ce desfășoară un nivel ridicat al activității metabolice sunt caracterizate printr-un nivel ridicat al endopoliploidiei . La planta *Allium carinatum*, s-a demonstrat că, în vârful rădăcinii sinteza ARN continuă în timpul stadiului de dispersie endomitotică, respectiv faza „Z“, dar încetează în timpul mitozei. Scharpe (1973) sugerează existența unei corelații între nivele ridicate ale endopoliploidiei în celulele parenchimatice ale cotiledoanelor în dezvoltare, de la mazăre – *Pisum sativum* și rata ridicată a sintezei de ARN și de proteine.

Se consideră ca reglarea activității unor gene specifice în celulele cu nuclei endopoliploizi este mult mai eficientă și economică decât într-un grup de celule cu nuclei diploizi, altfel spus, coordonarea activității celulare se face mult mai ușor când numărul de celule este mai mic.

Baterrfass (1968) a găsit un alt posibil avantaj al endopoliploidiei, demonstrând că numărul de cloroplaste per celulă este în legătură directă cu nivelul de endopoliploidizare atins de celule și s-ar părea că celulele care prezintă cantități ridicate de ADN au avantaj metabolic în comparație cu țesuturile ce au celule mici.

La Angiosperme, starea de endopoliploidizare se manifestă încă din stadiul de embriogeneză în organe cum ar fi suspensorul embrionar și cotiledoanele care prezintă o scurtă, dar înaltă activitate, în timpul embriogenezei și germinării.

Un al doilea moment al endociclurilor este observat în cursul diferențierii finale a organelor și țesuturilor.

Fenomenul endociclurilor urmează după proliferarea mitotică în vârful lăstarilor, al rădăcinii, etc.

Endopoliploidia are o mai largă răspândire decât s-a crezut. În afară de apariția ei în cazuri patologice, endopoliploidia apare ca un proces normal la plante și animale. La unele plante diploide, țesuturile conducătoare ale rădăcinilor sunt poliploide ca și celulele mamă ale tuburilor laticifere, celulele colenchimatice sau idioblastele (Tschermak-Woess și Hasitschka, 1954). Müntzing (1961) a descris endopoliploidia în rădăcinile de spanac. Wipf și Cooper au constatat că celulele din nodozitățile leguminoaselor, implicate în fixarea simbiotică a azotului, sunt tetraploide sau octoploide.

2. MORFOLOGIA CROMOZOMILOR POLITENI AI PLANTELOR

Cromozomii politeni reprezintă forma interfazică sub care apar cromozomii obișnuiți, atunci când la nivelul lor se desfășoară numeroase runde de replicare, neurmate de separarea produșilor de replicare.

Cromozomii politeni constituie o dovadă directă a continuității structurilor cromozomale din diviziune în interfază, oferind un prilej unic de a vizualiza structurile cromozomale interfazice care, altfel, nu pot fi observate microscopic, deoarece, în celulele interfazice obișnuite ele sunt în stare decondensată. La cromozomii politeni are loc o condensare a acestor structuri (cromoneme), dar mai redusă, nu de nivelul condensării cromozomului metafazic, cromonemele suferind totodată o ordonare într-o dispoziție paralelă.

Prezența cromozomilor politeni la plante a fost semnalată încă din 1898, de către Osterwalder, în celulele antipodale de la *Aconitum* (Nagl, 1981). Evident, autorul a recunoscut cromozomii politeni. Dar aceste structuri nu au fost înțelese de autor... și, deoarece genul *Aconitum* prezintă cromozomi politeni doar ocazional, descrierea a fost uitată de comunitatea științifică.

Mai târziu, în 1956, Tschermak-Woess și alți citologi de la Universitatea din Viena au reluat investigațiile la genul *Aconitum*, într-un studiu sistematic privind endopoliploidia și astfel, cromozomii politeni au fost redescoperiți.

Deoarece cromozomii politeni la plante nu prezintă un model de benzi și interbenzi, ei au fost inițial desemnați ca fiind structuri asemănătoare cromozomilor uriași (*„giant chromosome-like structures“*). (fig.1)

Astăzi, este binecunoscut, că morfologia cromozomilor politeni poate varia atât la plante cât și la animale.

Având în vedere similitudinile fundamentale la toate structurile politene, nu există nici o distincție legată de terminologie, între cromozomii politeni de la plante și cei de la animale. Au fost semnalate doar câteva diferențe minore între cromozomii politeni tipici de la diptere (ex. *Drosophila, Chironomus*) și cei mai mulți cromozomi uriași de la plante.

La plante, structuri politene pot fi observate numai ocazional. Spre deosebire de situația întâlnită la animale, în cazul plantelor, cromozomii politeni nu realizează

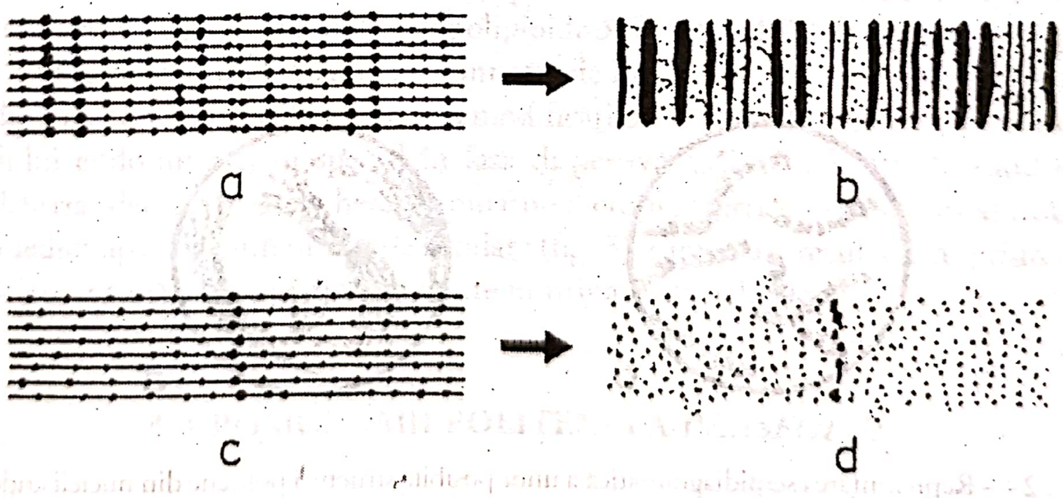


Fig.1 — Reprezentarea schematică a organizării cromozomilor politeni a) și b) Diptere, c) și d) Angiosperme (după Nagl W., 1981).

împerechere somatică (excepție făcând ocazional, cromozomii de la *Bryonia dioica*), deși omologii sunt apropiați unul față de celălalt. (Barlow, 1975). La plante, cromozomii politeni se caracterizează printr-o variabilitate structurală și funcțională înaltă, atât la nivelul unui țesut, cât și în timp, de la un an la altul. Astfel, în celulele antipodale de *Papaver rhoeas*, cromozomii prezintă stadii de organizare morfologică diferite, de la grupare în mănunchiuri, la stadiul în care porțiunile eucromatice ale endocromozomilor radiază din cromocentrii (Hasitshka-Jenschka, 1959) (fig. 2).

În celulele suspensorului embrionar de la *Phaseolus*, cromozomii politeni pot apărea bandați, granulari sau buclați, cu capetele mai mult sau mai puțin despicate (Nagl, 1972). La speciile de *Rhinanthus*, cromozomii politeni prezintă o organizare granulară, cromomerică (Tschermack-Woess, 1957, 1967).

În general, la plante, cromozomii politeni din celulele cu grad scăzut de ploidie, au o structură asemănătoare unui cablu (*cable-like*), iar în celulele cu grad înalt de ploidie, ei prezintă un aspect granular, prezentând din loc în loc unele benzi heterocromatice. Absența frecventă a benzilor distincte la nivelul eucromatinei

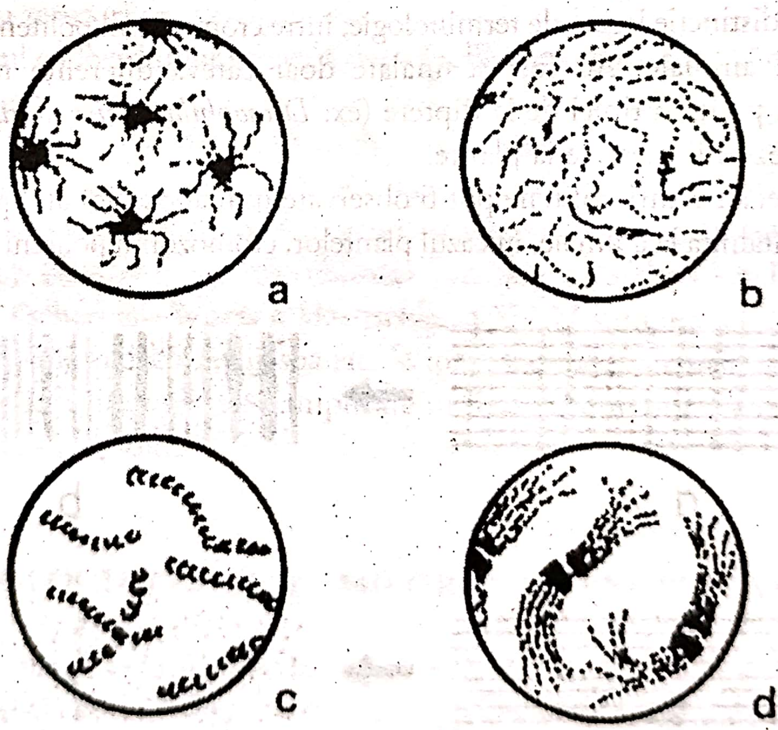


Fig. 2 — Reprezentarea semidiagramatică a unor posibile structuri politene din nucleii endopoliploizi antipodiali, de la Papaver rhoeas : (a)cromozomi in care se remarca prezența endocromocentrilor cu regiuni eucromatice ce radiază de la nivelul lor, (b) fibre cromatinice izolate, decondensate, (c) fibre cromatinice spiralate, (d) cromozomi politeni (după Nagl, 1981).

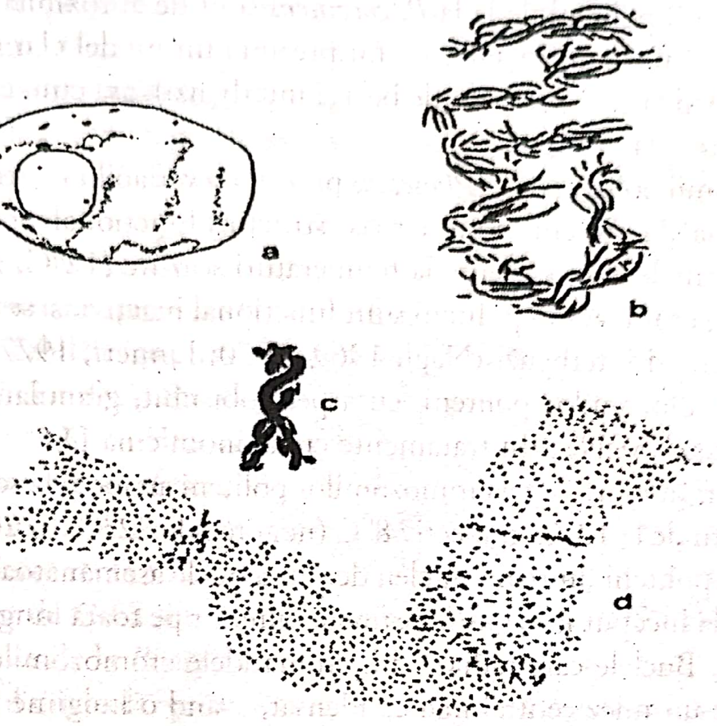


Fig. 3 — Exemple de politenie la plante : a) Nucleu înalt endopoliploid din endospermul de Zea mays (b) profaza 16-polidă din maduva stem de la *Knipholia natalensis*, prezentând octuplocromozomi; (c) cvadruplu cromozomi din radacinile de la *Allium cepa*; (d) cromozomi politeni dintr-un nucleu antipodal de *Aconitum variegatum* (după Nagl W., 1981)

ar putea fi atribuită slabei tendințe de grupare a acesteia, ca urmare a stării dispersate a heterocromatinei în timpul endopoliploidizării (Nagl, 1978) (fig. 2).

Endocromozomii la plante nu sunt atât de intim asociați ca în cazul celor de la diptere, aceasta probabil din cauza modificărilor structurale care apar în timpul ciclului endomitotic, în special în faza dispersivă, „Z" (Nagl, 1972), când se realizează decondensarea heterocromatinei cromocentrice. Aceste modificări împiedică apariția unui model de bandare (fig. 3), care poate rezulta doar printr-o asociere intimă a cromatidelor apărute în urma endociclurilor.

3. CROMOZOMII POLITENI LA *PHASEOLUS*

Cromozomii politeni din celulele suspensorului embrionar de la *P. coccineus* au fost detectați de W. Nagl (1962). Celulele suspensorului prezintă o creștere gradată a nivelului de endopoliploidie, de la embrion spre celulele bazale.

Cromozomii politeni de la la *P. coccineus* sunt de aproximativ 30 de ori mai lungi decât cromozomii metafazici, nu prezintă un model clar de diferențiere a structurilor bandate (succesiune de bezi și interbenzi), așa cum este cazul cromozomilor politeni la Diptere.

Cromozomii politeni de la *Phaseolus* prezintă o variabilitate structurală ridicată și a fost semnalată prezența a numeroase structuri funcționale, pe toată lungimea lor. Când plantele sunt crescute la temperaturi scăzute (12^0C, pe timpul zilei și 8^0C noaptea) cromozomii politeni sunt funcțional inactivi, și se condensează sub formă de benzi și interbenzi (Nagl, 1969, 1970; Linnert, 1977). O condensare similară a cromozomilor politeni, cu aspect obișnuit, granular, are loc și după stoparea sintezei ARN, prin tratamente cu actinomicină D.

Modificări în morfologia cromozomilor politeni au loc și la schimbarea bruscă a temperaturii de la 12^0C, respectiv 8^0C (noaptea) la 22^0C. În 20 de minute, toți cromozomii politeni dintr-un nucleu dezvoltă bucle asemănătoare cromozomilor lampbrush, la inceput în regiuni distincte, ulterior pe toată lungimea porțiunilor eucromatice. Buclele care radiază din cromatidele cromozomilor politeni își au originea într-un miez central mai condensat, având o lungime între 4-50 μm și un diametru cuprins între 0,25 — 0,40 μm. Regiunile terminale ale unor bucle formează rețele sferice și se încarcă cu particule (material sintetizat de fibrele cromatidice). În final, particulele fuzionează pentru a forma corpusculi asemănători nucleolilor, care sunt eliberați de la nivelul cromozomilor.

Faptul că regiunile decondensate (pufate) ale cromatinei, și nu regiunile condensate sunt mai active în sinteza ARN, a fost demonstrat prin tehnici autoradiografice (tratament cu ^{3}H — uridina) (Nagl, 1969)

Au fost evidențiate modificări structurale în anumite regiuni ale cromozomilor politeni (eucromatină, heterocromatină și regiunile organizator nucleolare). În

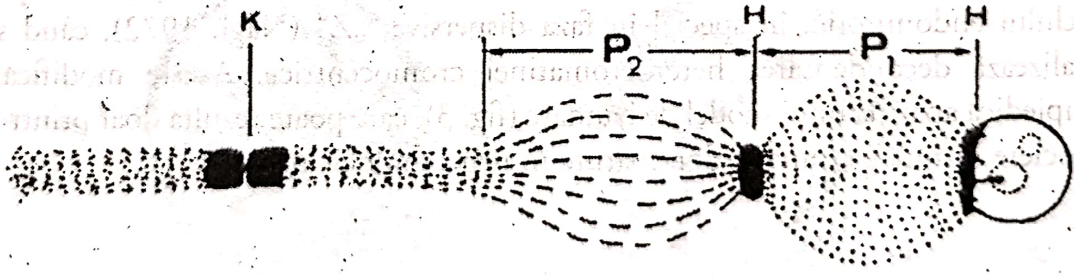


Fig. 4 Reprezentarea schematică a unui cromozom politen la *Phaseolus* (probabil nr. 2) cu două regiuni pufate (P_1 și P_2), benzi heterocromatice (H) și un micronucleol format la nivelul heterocromatinei telomerice. Regiunea kinetocorului (K) este de asemenea clar vizibilă (după Nagl W., 1981).

celulele gigante, în perechea 2 de cromozomi au fost evidențiate 2 pufe oarecum diferite ca structură (fig. 4).

Aceiași cromozomi politeni prezintă și un nucleol suplimentar (micronucleol) care se formează la nivelul unei benzi heterocromatice telomerice. În celulele mai bătrâne ale suspensorului, sau după tratamente cu actinomicina D, pufele dispar. Ceilalți cromozomi politeni prezintă pufe cu structură variată (expansiuni granulare, rețele fibroase, etc) la nivelul unor regiuni neidentificate (Nagl, 1970).

Au fost evidențiate „pufe" la nivelul regiunilor heterocromatice în numeroși cromozomi din celulele gigante (Nagl, 1967). Ulterior, aceste regiuni au fost interpretate ca fiind pufe ADN, similare celor de la Sciaridae, evidențiate de Avanzi și colaboratorii. (1970) și Forino și colaboratorii (1979).

Tehnicile autoradiografice și densitometria scanning pe preparate colorate Feulgen, folosite inițial, nu au putut demonstra amplificarea ADN la nivelul acestor regiuni. Evidențierea replicării diferențiate a ADN a fost realizată prin centrifugarea ADN în gradient de CsCl și prin tehnicile de hibridizare ADN/ARN ribozomal din diferite organe de la *Phaseolus*.

Organizatorul nucleolar prezintă modificări structurale importante, în strânsă conexiune cu nivelul activității sintetice .

În celulele active, aceste regiuni organizator nucleolare apar ca mănunchiuri de fibrile sau cromatide separate, și probabil, sub formă de bucle submicroscopice în celulele inactive, în aceste din urmă organizatorii nucleolari se condensează sub formă de *knobi heterocromatici*, iar fibrilele intranucleolare fuzionează într-o fibră bandată.

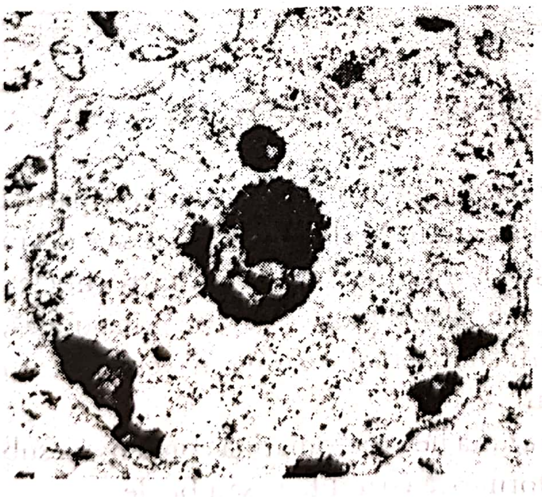


Fig. 5 — Amplificare genică ribozomală în nodozități de fasole (*Phaseolus vulgaris*) (x 14.000) (original).

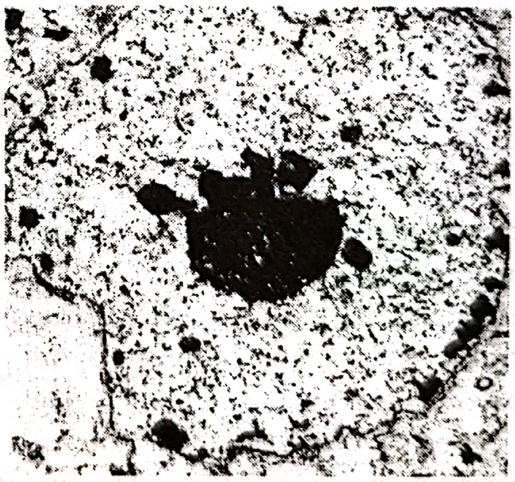


Fig. 6 — Amplificare genică ribozomală în nodozități de fasole (*Phaseolus vulgaris*) (x 14.000) (original).

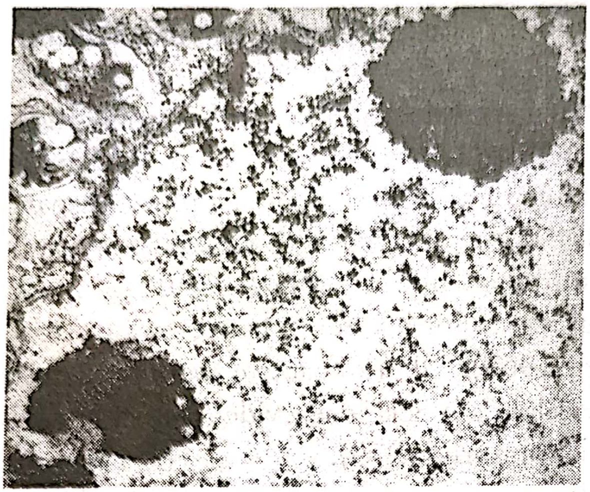


Fig. 7 — Nucleu cu cromozomi politeni în nodozități de fasole (*Phaseolus vulgaris*) (x 38.270) (original).

În celulele active ale suspensorului embrionar, nucleolul este puternic lobat și vacuolat iar de pe suprafața acestuia sunt eliberați numeroși micronucleoli. Acești micronucleoli originari din benzile heterocromatice și buclele eucromatice, migrează prin nucloplasmă spre anvelopa nucleară, unde se descompun sub formă de agregate RNP libere și străbat anvelopa spre citoplasmă. Uneori, por fi observate și evaginări ale membranei nucleare, ca rezultat al activității de transport (Nagl, 1973). În imaginile electronomiscroscopice se remarcă prezența în citoplasmă a numeroase granule RNP, care se dispersează gradat prin celulă (Nagl și Fuhrmann, 1981).

În timp ce pentru micronucleolii desprinși de la nivelul nucleolului identificați în cercetările noastre (fig. 5–7) este evident de ce conțin material ribozomal, pentru ceilalți micronucleoli, desprinși de la nivelul diferitelor regiuni cromozomale, nu este demonstrat de ce conțin particule RNP. Studiile de hibridizare *in situ*, efectuate în acest sens, nu au adus rezultate satisfăcătoare. (Avanzi și colaboratorii., 1971, 1972, Brady and Clutter, 1972).

4. CROMOZOMII POLITENI LA TROPAEOLUM

Suspensorul embrionar la *Tropaeolum majus* este o structură mare, tripartită care servește ca haustor pentru nutriția embrionului. Multe din celulele sale devin înalt endopoliploide (mai mult de 1048n). În timp ce unii dintre nucleii endopoliploizi prezintă aceleași structuri ca și nucleii diploizi (ex. cromatină difuză, cromocentrii), altora le lipsesc cromocentrii cu heterocromatină subreplicată sau prezintă cromozomi politeni. (Nagl, 1976).

Cromozomii politeni la *Tropaeolum* prezintă heterocromatină condensată sub formă de benzi, în timp ce eucromatina formează cozi difuze sau bucle.

Subreplicarea heterocromatinei în nucleii celulelor suspensorului embrionar a fost demonstrată prin citofotometrie scanning și prin analize structurale ale ADN izolat (Nagl, 1978).

ADN satelit de la *Tropaeolum* nu este subreplicat — fapt demonstrat prin hibridizare in situ. (Denmling and Nagl, 1978). Localizarea ADN satelit în regiunile organizator nucleolare a demonstrat natura sa ribozomală. ADN subreplicat de la nivelul heterocromatinei este compus din secvențe repetitive, heterogene de ADN, care, în urma centrifugării în gradient de CsCl nu formează o bandă satelit

5. CROMOZOMII POLITENI LA RHINANTHUS

Tschermak-Woess (1957, 1967) au semnalat prezența cromozomilor politeni în endospermul haustorului (particular în țesutul chalazal al haustorului) la ovulele de *Rhinanthus alectorolopus, Rh. minor, Rh. serotinus* și *Rh. aristatus.* Celulele haustoriale conțin fiecare câte doi nuclei giganți ce prezintă nivele ridicate de ploidie (384n).

Cromozomii politeni la această specie prezintă o organizare granulară, cromomerică.

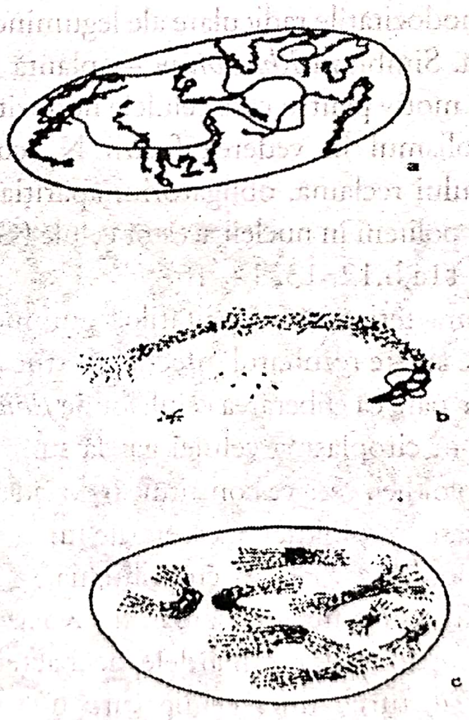


Fig. 8 — Desen realizat la camera-lucida: cromozomi politeni la două specii de plante (a) Nucleu dodecaploid din haustorul chalazal de la *Rhinanthus*; (b) Cromozom politen la *Rhinanthus*; (c) Nucleu politen dintr-o celulă antipodală (16n) de la *Dicentra spectabilis* (după Nagl W., 1981).

Centromerul situat subterminal nu poate fi identificat în cromozomii politeni, dar, regiunea în care, probabil, se găsește centromerul, este alcătuită din heterocromatină densă care este în contact cu nucleolul. Cea mai mare parte din cromzomii politeni prezintă o heterocromatină granulară și difuză, mănunchiuri fine de eucromatină fiind observate doar pe o distanță mică, la telomere. În timp ce în endospermul triploid, doar 9 cromozomi sunt organizatori nucleolari (ex. doar trei în complementul haploid), în nucleii politeni mai mult de 21 de cromozomi sunt asociați, la brațele lor mai scurte (care prezintă capete heterocromatice) cu nucleolii mari, adesea ramificați. Ceilalți formează un nucleol suplimentar, mic, la nivelul regiunilor heterocromatice (fig. 8)

6. CROMOZOMII POLITENI DIN CELULELE NODOZITĂȚILOR RADICULARE ALE LEGUMINOASELOR

Cromozomi politeni și multiplii nucleoli au fost observați și la nivelul celulelor din nodozitățile radiculare ale leguminoaselor, celule infectate cu *Rhizobium* sp. Cromozomii politeni din nodozitățile radiculare ale leguminoaselor reprezintă un caz de politenie patologică. Simbioza *Rhizobium* — plantă leguminoasă asigură fixarea azotului molecular, motiv pentru care celulele nodozității plantei își intensifică foarte mult metabolismul în vederea fixării N_2 cu maximă eficiență. Intensificarea metabolismului reclamă, obligatoriu, apariția amplificării genice, deci apariția cromozomilor politeni în nucleii acestor celule (Gavrilă, 1993; Gavrila și colab. 1998) (fig 9, 10, 11a,b,12, 13, 14, 15).

Endopoliploidia care caracterizează nodozitățile leguminoaselor apare doar în zona cordonului de infecție și este rezultatul infecției. Intrucât celulele neinfectate rămân totdeuna diploide, se pare că eliberarea celulelor de *Rhizobium*, din cordonul infecțios și înglobarea lor în citoplasma celulei gazdă sunt etape indispensabile pentru inducerea endopoliploidiei, ceea ce constituie o dovadă în favoarea existenței unui factor bacterian inductor al ploidiei. Cercetările lui Gavrilă și colab. (1993, 1998) au dovedit că poliploidia se asociază cu politenia.

În celulele nodozităților radiculare, angajate în fixarea azotului, mitocondriile dispar, citoplasma având în locul lor miliardele de bacterioizi de *Rhizobium*. Mitocondriile ar încurca rosturile unei celule care nu face altceva decât să adăpostească fabricile fixatoare de azot molecular — bacterioizii. Pentru aceasta, trebuie să ofere condiții propice. Cu cât mai repede asigură atmosfera anoxică, cu atât mai repede și cu o productivitate mai mare intră în funcțiune „fabricile" fixatoare de azot molecular. Dar, pentru a asigura această atmosferă anoxică este nevoie de sinteză bogată de leghemoglobină. Pentru aceasta, celula adoptă

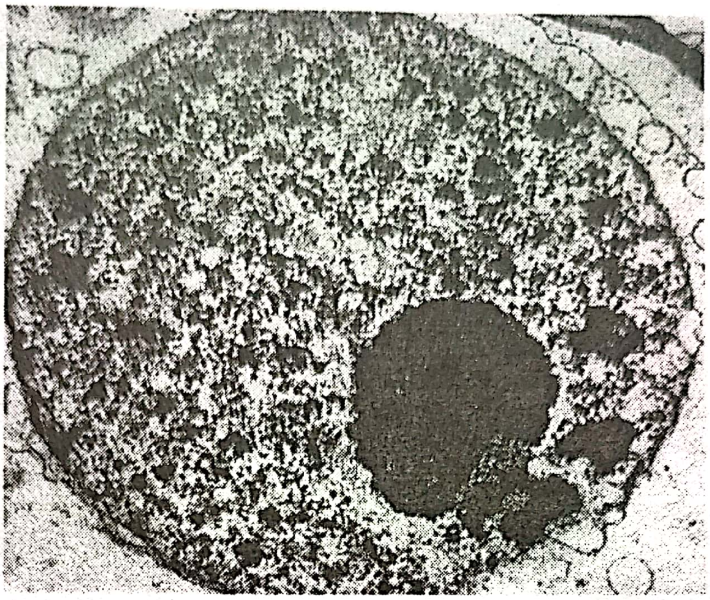


Fig. 9 — Amplificare genică ribozomală exprimată ca multiplii nucleoli extracromozomali la *Trifolium pratense*. Întreaga sferă a nucleului prezintă profile de cromozomi politeni (original).

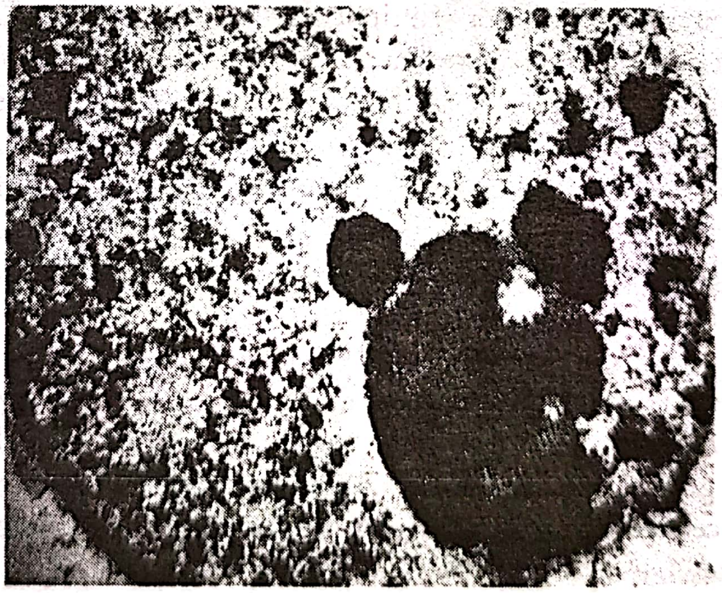


Fig. 10 — Nucleoli extracromozomali și profile de cromozomi politeni în celula înalt poliploidă din nodozități de *Trifolium pratense* (X 42.000) (original).

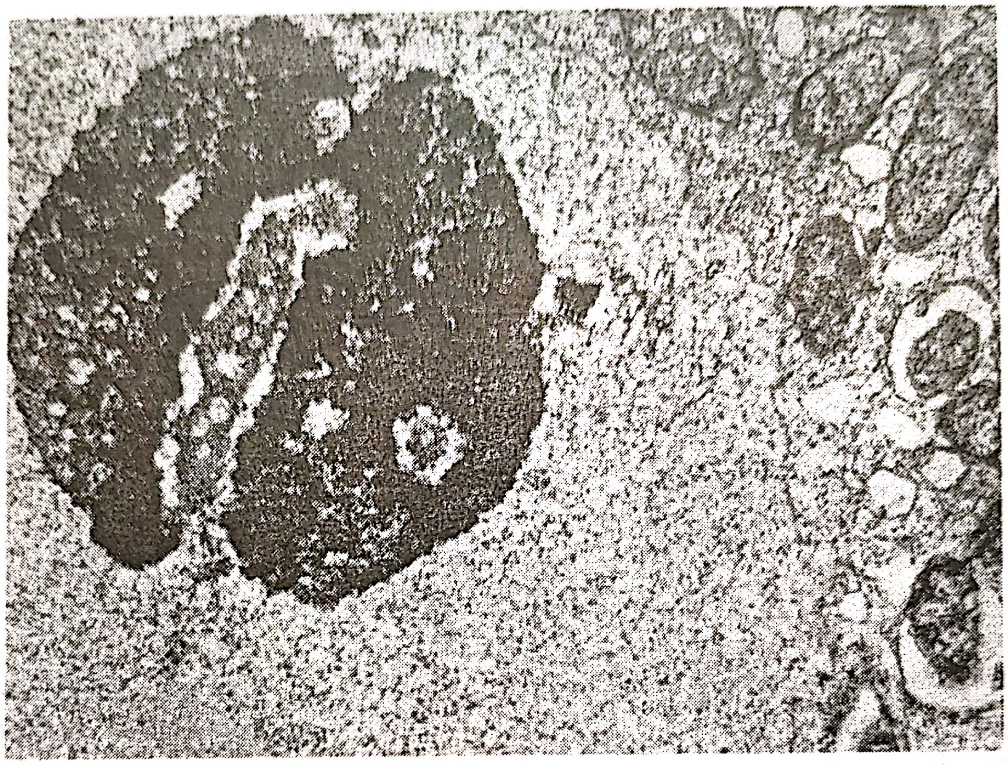


Fig. 11 — Organizarea nucleolului în nodozități de trifoi (după Gavrilă și Mihăescu, 1987).

mecanismul politeniei, după ce, în prealabil, și-a asigurat un prim nivel de amplificare a tuturor genelor prin poliploidizare. Ulterior multiplicării întregului genom, politenia poate asigura multiplicarea tuturor genelor, dar funcționarea numai a unora dintre ele o poate realiza prin ordonarea pufării. Amplificarea genelor ribozomale este necesară pentru producția înaltă de ribozomi în vederea realizării unei intense sinteze proteinice, într-un timp foarte scurt. Organizarea genomică în celulele nodozităților radiculare exprimă întreaga „înțelepciune" a celulei — unitate fundamentală a vieții, de a-și organiza structurile și funcțiile în raport strict cu condițiile specifice, concrete, de care dispune la un moment dat. Numai că, adoptând politenia, celula pornește pe un drum fără întoarcere, pentru că, la capătul activității sale scurte, dar extrem de intense, celula este epuizată și moare. De altfel, în cazul politeniei, multe din genele esențiale, vitale (*house-keeping*) sunt silențiate (ex. genele mitocondriale esențiale respirației celulei, genele tubulinelor, complexul de gene al ciclului mitotic). Astfel, viața celulară fiind strâns dependentă de diviziunea celulară, în acest caz, celulele cu nuclei politeni se îndreaptă fatalmente spre apoptoză.

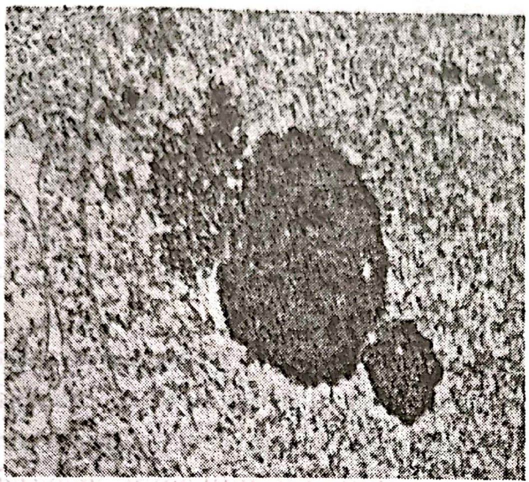


Fig. 12 — Comozom organizator nucleolar cu Regiune Organizator Nucleolară (RON) din nodozități de trifoi (după Gavrilă și Mihăescu, 1987).

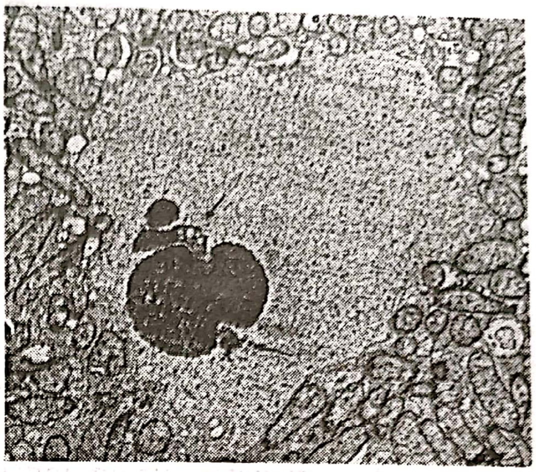


Fig. 13 — Regiunea organizator nucleolară la trifoi (săgețile); se observă prezența a numeroși bacteroizi ce înconjoară nucleul (după Gavrilă și Mihăescu, 1987).

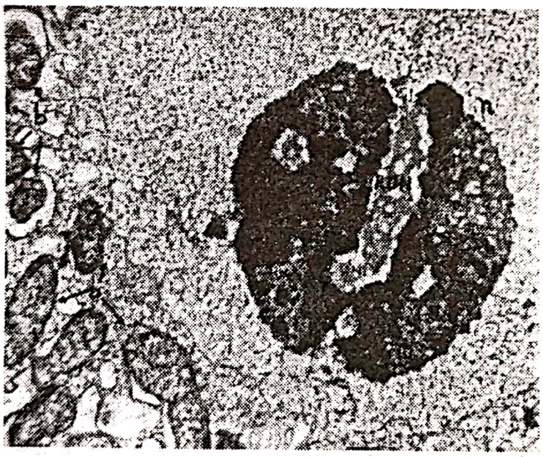


Fig. 14 — Amplificare genică ribozomală în nodozități de trifoi (*Trifolium pratense*) (RON= Regiune Organizator Nucleolară; n= nucleol; b= bacteroizi) (după Gavrilă și Mihăescu, 1987)

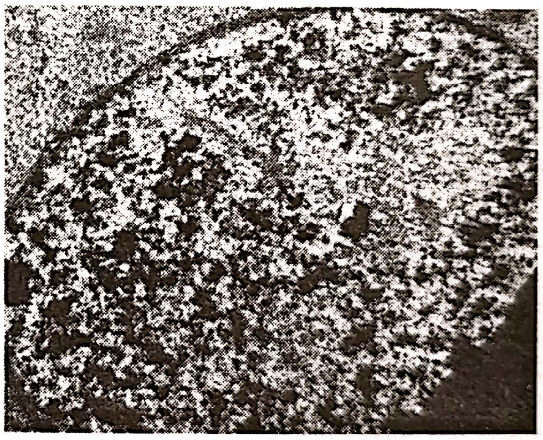


Fig. 15. Cromzomi politeni în nodozitățile de trifoi (original).

7. CONCLUZII

Cromozomii politeni sunt cromozomi interfazici, ce își au originea în cromozomii complementului cromozomal normal din celulele somatice obișnuite, care se divid mitotic până la un moment dat, când intră într-un ciclu de endoreduplicare, își replică materialul genetic de nenumărate ori, dar fiecare rundă de replicare nu este urmată de diviziunea nucleului, numeroasele runde de sinteză a materialului cromatic având loc în interiorul aceluiași nucleu.

Limitarea politeniei la câteva specii, cu dimensiuni ale genomului relativ mici, este interpretată ca o strategie evolutivă menită să substituie lipsa creșterii filogenetice a ADN. Este necesar ca aceste celule să-și sporească capacitatea funcțională și activitatea într-un timp scurt, de exemplu în timpul embriogenezei.

Politenia poate fi utilizată și ca un sistem model pentru înțelegerea rolului cromatinei în determinare și diferențiere, având posibilitatea unei bune vizibilități microscopice asupra tuturor schimbărilor în pattern-ul cromatinei.

Nucleii politeni la plante, datorită variabilității structurale foarte ridicate nu pot fi folosiți ca material de studiu pentru modelul de pufare, dar, ei sunt foarte folositori pentru studiul interacțiunii organismului cu mediul, conținutul ADN, funcționarea celulei și organizarea cromatinei (în relație cu diferențierea celulei).

CAPITOLUL XXV

EPIGENOMICA

1. TERMINOLOGIA SPECIFICĂ DOMENIULUI EPIGENETICII

Una dintre problemele majore ale **geneticii moleculare** este înțelegerea mecanismelor implicate în **controlul expresiei genelor la organismele eucariote complexe.** În ciuda numeroaselor descoperiri bazate pe disecția genelor individuale, la nivelul nucleotidelor componente, factorii implicați în orchestrarea activității genelor în decursul dezvoltării organismelor, în speță a celor eucariote, au rămas incomplet definiți.

O cauză majoră a unei astfel de limitări a constituit-o abordarea acestui aspect esențialmente pe baza *mutantelor*, respectiv, a corelației simple: *variația expresiei unei gene* (fenotipul) ca rezultat al *modificării secvenței acesteia* (genotipul). Aceste **modificări genetice** (mutații) au explicat însă insuficient variația expresiei genelor observată în decursul dezvoltării organismelor superioare. Studiile de secvențiere au relevat faptul că, în organismele complexe, genele pot prezenta o *dinamică a expresiei, în sensul spațio-temporal,* fără să-și modifice, însă, secvența primară, respectiv, informația genetică. O astfel de dinamică a fost detectată în țesuturile specifice din cadrul unui organism — în decursul etapelor de *dezvoltare* sau în decursul proceselor de *adaptare* la diferite condiții de mediu, având însă un caracter ereditar. O asemenea modificare spațio-temporală a expresiei genice, adesea reversibilă, însă cu repercursiuni importante atât la nivelul unui anumit individ, cât și la nivelul descendenților, poartă denumirea de **modificare epigenetică.**

Abordările moderne, diametral opuse celor clasice, au permis diferențierea celor două tipuri de modificări în cadrul genomului și, prin aceasta, au condus la dezvoltarea explozivă a unui domeniu deosebit de actual al biotehnologiei: manipularea genetică a organismelor, respectiv, ameliorarea plantelor și animalelor asistată de markeri moleculari. Dacă abordarile clasice nu au beneficiat de informații precise privind patrimoniul genetic al indivizilor, ci s-au bazat pe identificarea fenotipică a indivizilor purtători de caractere de interes, abordările moderne pornesc de la descifrarea directă a informației genetice înscrisă, în secvența unor markeri moleculari definitorii pentru fiecare individ, pentru ca ulterior, pe baza relației funcționale dintre structură genetică și fenotip, să fie selectați indivizii „funcționali genomic", utili din punct de vedere economic.

O concluzie generală care a reieșit dintr-o astfel de abordare inversă a fost cea referitoare la noțiunea nouă a genei, în contextul unor concepte noi privind mutația și variabilitatea organismelor: aceasta din urmă nu este definită doar pe baza mutațiilor deja „fixate" în genom, ci și pe baza modificărilor epigenetice ce afectează anumite regiuni ale ADN genomic, determinând *predispoziția* genomului respectiv la mutații. Ultimele două decenii ale secolului al XX-lea au fost dedicate cu precădere acestor tipuri de modificări epigenetice care au loc în cadrul materialului genetic, în special la organismele eucariote, modificări aparent minore, dar cu posibile repercusiuni dramatice asupra expresiei genice și implicit asupra dezvoltării acestor organisme. Pornind de la astfel de modificări, s-a dezvoltat un nou domeniu, care a definit un nivel informațional, adițional celui genetic, denumit nivelul **epigenetic** al expresiei genice (Szyf, 1991).

„Epigenetic" reprezintă un termen generic atribuit acelor fenomene care nu afectează *secvența nucleotidelor* din structura primară ADN, respectiv *genotipul*, ci doar *modificarea chimică nemutagenă a bazelor azotate* din secvența de nucleotide preexistentă în ADN și care încapsulează în ea informația genetică normală. O astfel de modificare epigenetică care nu alterează conținutul informației genetice, dar interferă cu funcționarea acesteia poate avea loc, prin *mecanisme biochimice (fiziologice)*, de obicei catalizate de enzime specifice din cadrul celulei. Cea mai frecventă modificare de acest tip este reprezentată de *metilarea inelelor* purinice și pirimidinice ale bazelor, însoțită de transformarea *bazelor majore în baze minore*. Ea poate conduce, spre deosebire de mutații sau modificările genetice, la *modificarea spațio-temporală* a expresiei manifestată în *fenotip* a unor gene din cadrul genomului, cu alte cuvinte, la *activarea/represia* genelor respective, în țesuturi și etape specifice ale dezvoltării organismului. Dimpotrivă, *mecanismele chimice facilitate de condiții drastice* (acțiunea unor agenti chimici, fizici, biologici externi) pot conduce la *alterarea*, până la *dispariția* fenotipului corespunzător genelor respective, fenomene asociate până în prezent cu *mutageneza*.

Organismele superioare eucariote și-au pus la punct, pe lângă un sistem deosebit de complex de funcționare a *informației genetice (moștenite)*, un nivel adițional de informație, respectiv *informația epigenetică* , care are la sorginte tot un caracter ereditar. Fluxul adițional de informații are atât rolul de *păstrare și echilibrare* permanentă a fluxului de informație genetică, în procesul de interacție al organismului respectiv cu mediul, cât și rolul de *modificare* treptată, în anumite condiții, a informației genetice.

Mecanismele propuse pentru explicarea fenomenelor epigenetice au la bază considerarea *etapelor de control a expresiei genice*: „transcripțională“ (la nivelul ADN) și posttranscripțională (la nivelul transcriptelor ARN), translațională (la nivelul formării complexului ribosomal, angajat în sinteza proteinică) și posttranslațională (la nivelul structurilor terțiare, cuaternare ale catenelor polipeptidice); acestea, în ansamblu, implică factori capabili de a induce **modificări epigenetice**, care pot altera căile de biosinteză sau activitatea polipeptidelor, respectiv, apariția fenotipului codificat de informația genetică.

Actualmente, termenul „epigenetic' tinde să fie substituit de cel „epigenomic“, ca o reverbereație a marilor performanțe realizate atât în secvențierea genomului speciilor model de plante și animale, și al speciei umane, cât și în descifrarea secvențelor aminoacidice ale fenotipurilor corespunzătoare. Cele două domenii corelative moderne, *genomica* și, respectiv, *proteomica* pot fi abordate astăzi prin intermediul tehnicilor de înaltă performanță *("high throughput")*, aplicate unui număr statistic de probe. Domeniul de legătură, singurul în măsură să explice fenomenele de variație a expresiei genice în condițiile unui *background* genetic stabilizat evolutiv de milenii, este considerat a fi *„epigenomica“*.

Pe baza unor astfel de considerente, au fost explicate numeroase aspecte legate de citodiferențierea în culturi de celule și țesuturi ("in vitro"), un domeniu modern al manipulării organismelor eucariote, cu multiple valențe teoretice și aplicative. Cercetările de transgeneză, recent abordate, au contribuit, de asemenea, la înmulțirea datelor doveditoare ale implicării procesului epigenetic în modularea expresiei genelor străine sau autohtone, fără ca acestea să își modifice structura primară (informația genetică). Totodată, a fost posibilă explicarea și dovedirea dezvoltării normale și patologice, care au inclus, recent, procesele complexe de *imprinting* și gametogeneză, ca și cele de embriogeneză, la organismele eucariote.

În cadrul ansamblului de procese reglatoare ale expresiei genice, enumerate anterior, *modificările epigenetice la nivelul ADN* se remarcă pregnant în abordările recente ale expresivității genelor eucariote. Astfel de modificări vizează alchilarea (metilarea) inelelor pirimidinice sau purinice ale bazelor azotate și păstrează nealterată ordinea acestora în secvența primară. Studiul efectelor **metilării bazelor** asupra structurii materialului genetic și asupra expresiei acestuia au marcat, în ultimele două decenii, dezvoltarea unui domeniu deosebit de modern în cercetările actuale ale geneticii, **domeniul metilării ADN**.

Deși de cca 40 de ani se cunoaște faptul că, în cadrul ADN eucariot, există o fracție a resturilor de citidină, adenină și guanină metilate, metilarea ADN la eucariote a reprezentat mult timp o așa-zisă „cutie neagră“, intens dezbătută.

Absența aparentă a metilării, observată într-o perioadă anterioară la unele organisme, cum ar fi drojdiile sau *Drosophila*, a determinat pe unii cercetători să speculeze faptul că această modificare a bazelor nu ar juca un rol central în viața celulei eucariote. Dovada recentă a prezenței acestei sistem de modificare ADN și la organismele respective a condus la concluzia privind importanța sa crucială în toate procesele vitale și, totodată, a deschis calea unor abordări noi, mai blânde, ale expresiei genice normale și patologice, prin controlul dinamicii metilării ADN.

După cum s-a observat în nenumărate cazuri, se poate spune că natura își rezolvă problemele întotdeauna prin căi alternative. Studiile dinamicii metilării ADN la o multitudine de organisme au relevat faptul că acest proces nu este pur și simplu decorativ, astfel precum nici o structură menținută de organismele vii de-a lungul evoluției nu s-a dovedit inutilă (egoistă sau “*selfish*“, nefolositoare sau „*junk*“ etc.).

S-a dovedit faptul că tocmai astfel de structuri, corelate cu *modificarea aparent minoră a bazelor*, dețin un potențial extraordinar de protejare și echilibrare a secvențelor codificatoare de gene, dar și de modificare dramatică a acestora, în anumite condiții. În contextul *noului concept de „genă“*, îmbogățit prin cele *două fluxuri informaționale, genetic/epigenetic*, este posibilă actualmente reconsiderarea principiilor de bază ale mutagenezei, adaptării, selecției și, nu în ultimul rând, ale evoluției organismelor eucariote complexe.

2. FENOMENE EPIGENETICE SAU INDEPENDENTE DE SECVENȚA ADN

Definiția acceptată privind fenomenul epigenetic se referă la „o modificare în cadrul funcției genei, care este reversibilă sau poate fi transmisă pe cale mitotică sau meiotică, a cărei explicație nu se bazează pe modificarea secvenței ADN“ (Russo și colab., 1996; Chadwick și Cardew, 1998). Pentru a extinde această succintă formulă, domeniul epigeneticii a inclus terminologia referitoare la așa — numita „*cenzură genetică*“. Cu alte cuvinte, s-a emis ipoteza implicării unor factori de control la nivel genomic, dar care acționează într-un *locus particular* și în *momente speciale*, având drept rezultat inactivarea sau activarea acelui locus. În mod remarcabil, un astfel de *program de menținere a unei **stări*** active sau inactive a unui locus dat, fără schimbarea secvenței primare de nucleotide, este caracterizat prin stabilitate: starea „cenzurată epigenetic“ se menține de la cele mai scurte perioade, reprezentate prin multiple diviziuni mitotice, până la întreaga viață a unui organism sau chiar de-a lungul unui număr de generații, până la o reversie ulterioară a represiei, care, la rândul ei, este stabilizată pentru următoarele noi generații. Ultimul caz demonstrează chiar faptul că modificarea epigenetică nu poate fi blocată, nici chiar de către meioză! Cu toate acestea, o astfel de *programare spațio-temporală* nu este conținută sau codificată *genetic*, respectiv în *secvența primară* de nucleotide a locusului respectiv, de unde și etimologia termenului **„epi-genetic“**, care se referă la fenomene ereditare ce par a avea loc în afară sau independent de secvența ADN, *epi* semnificând în limba greacă *„ceva aflat deasupra“*.

Demnă de menționat este distincția dintre: (i) *controlul epigenetic al funcției genomului* și (ii) *programele de expresie genică stabilă*. Spre exemplu, la metazoare, anumite gene sunt permanent și exclusiv activate doar în tipuri celulare unice. Astfel, la mamiferele euterine, globinele sunt exprimate doar în eritroblaste, insulina — în celulele insulelor Langerhans ale pancreasului, albumina serica — doar în hepatocite etc., în schimb sunt silențiate în toate celelalte tipuri celulare. Deși este stabil, acest tip de control nu se explică în mod normal prin fenomenele epigenetice, deoarece se cunoaște faptul că sunt determinate de acțiunea unor secvențe reglatoare ADN (promotori și enhanceri), ce sunt conținute în cadrul locilor respectivi (acțiunea lor fiind corelată evident, cu acțiunea proteinelor cu afinitate specifică pentru ADN).

Dimpotrivă, fenomenele epigenetice sunt evidente în cadrul unor procese vitale, precum cele enumerate mai jos:

– Un cromozom complet este inactivat transcripțional (cu excepția importantă a unei singure gene) în cadrul fiecărei celule mamaliene femele, dar această inactivare nu este codificată de o anume secvență primară ADN , ci mai degrabă, de numărul exact, normal, de cromozomi, dintr-un astfel de nucleu;

– În genomul mamiferelor euteriene, numeroase gene sunt „imprintate“, cu alte cuvinte, este exprimată doar o copie a genei (din punct de vedere funcțional, este hemizigoție pentru un anumit număr de loci, din cadrul genomului uman): alela „cenzurată“ pentru a fi silențiată este amprentată în întregime de linia parentală, maternă sau paternă. Ca atare, nu contează „ce proteină determină“ (prin secvența primară de nucleotide) alela considerată, ci doar „de la care părinte provine“ aceasta (fapt determinat de o anumită informație epigenetică, formată în cadrul gametogenezei) mascule sau femele;

– La unele specii de fungi, tipul de împerechere (sexul) al unei celule particulare nu se decide inițial de către genotipul celulei, ci este determinat mai degrabă de evenimentele care au avut loc cu două generații în ascendență (în celula -“bunică“);

– Atât la plante, cât și la animale, genomul se protejează în fața informației genetice parazite (cum ar fi elementele transpozabile și retrovirusurile endogene) prin menținerea acestora din urmă într-o formă silențiată. Cu toate acestea, contrar asteptărilor, acest tip de silențiere nu este determinat de către anumite secvențe primare unice, din cadrul unor astfel de informații genetice, ci, mai degrabă, de **numărul copiilor** acestor secvențe, integrate în cadrul genomului gazdă. Se presupune că celula, la un moment dat al evoluției organismului, nu este capabilă să sesizeze efectul deletoriu al acestor elemente parazite, pentru organismul gazdă. În schimb, are capacitatea de a detecta tocmai numărul de secvențe parazite integrate, care, se presupune că „deranjeaza“ structura cromatinică stabilizată în procesul evolutiv. Noile conformații determină activarea mecanismelor de cenzurare, ce ar avea ca efect silențierea elementelor parazite menționate.

Acestea reprezintă doar câteva exemple ale controlului epigenetic privind expresia genică și rolul său biologic în celulele eucariote. Timp de câteva decenii, începând cu anii 1970, ele au constituit un câmp de dezbateri intense pentru geneticieni și, mai cu seamă, pentru specialiștii din domeniul biologiei dezvoltării. Cu timpul, studiul unor fenomene de importanță vitală din cadrul biologiei dezvoltării, cum ar fi activarea/inactivarea tipurilor de împerechere la drojdii, imprintingul locilor particulari în gameti, adaptarea la diferite tipuri de stress, expresia specifică de țesut a anumitor gene etc. a devenit din ce în ce mai dificil datorită abordărilor clasice, dogmatice ale modelelor convenționale privind reglarea genică. Dar, la sfârșitul de secol XX și început de mileniu III s-a marcat o adevărată revoluție în gândirea geneticienilor: aceștia au acceptat treptat domeniul nou al epigeneticii. Istoricul acestuia ar explica într-o anumită măsură viteza mică prin care acest domeniu, denumit și „cutia neagră“ a geneticii, a reușit să se impună. Abordarea metodologică specifică perioadelor anterioare domeniului ADN recombinant și al ingineriei genetice, abordările clasice, la nivel cromozomal, cu toate că au reprezentat, pentru momentele istorice ale descoperirii lor, adevărate „pietre de hotar“ pentru genetică, au determinat stagnarea, pentru o perioadă de două decenii, a dezvoltării epigeneticii. Dimpotrivă, astăzi, metodologia specifică domeniului epigeneticii este capabilă să explice și să soluționeze numeroase probleme practice acute, neelucidate la acea vreme, cum ar fi corelația dintre instabilitatea cromozomală și dezvoltarea patologică.

3. SCURT ISTORIC AL CERCETĂRII EPIGENETICE

Ca în majoritatea ramurilor geneticii, numeroase fenomene epigenetice au fost inițial caracterizate la plante și insecte. La începutul anilor 1950, Barbara Mc Clintock, de la Cold Spring Harbor Laboratory, a descoperit faptul că elementul transpozabil *Spm* (supresor-mutator) din genomul porumbului poate fi inactivat și menținut în stare silențiată numeroase generații, până într-un moment ecologic adecvat reactivarii, de asemenea într-un mod ereditar (Mc Clintock, 1958).

Curând după această descoperire, R. Alexander Brink de la Universitatea din Wisconsin, Madison (SUA) a raportat rezultatele studiului său asupra unei alele a genei care controlează culoarea bobului de porumb: penetranța acesteia ar depinde uneori de genotipul plantei genitoare și nu de constituția genetică a plantei purtătoare a acestei gene. Acest fenomen remarcabil, denumit de către descoperitor *„paramutație"* (Brink, 1958), va reprezenta, peste două decenii, unul din exemplele majore prin intermediul cărora s-a demonstrat implicarea fenomenelor epigenetice, respectiv, ale metilării ADN, în variația expresiei genice dependentă de regiunea genomică a genei.

În 1930, Charles Metz, de la Universitatea Columbia, a descoperit un alt fenomen interesant: prezența unui mecanism neobișnuit de ereditate sexuală la insectele femele din genul *Sciara* — o femelă poate avea fie numai descendenți masculi, fie doar femeli. O explicație genetică pentru această particularitate a fost formulată ulterior, în 1960, de către o studentă a Barbarei Clintock, Helen Crouse, de la aceeași universitate: aceasta a realizat faptul că, în genul *Sciara*, cromozomii de origine paternă sunt într-un anume mod „marcați" ereditar, pentru a fi eliminați într-o generație ulterioară; fenomenul a fost denumit, în consecință, *„imprinting"* (Crouse, 1960). S-a constatat că acest proces de marcare pe linie sexuală ar fi prezent și la algele *Chlamydomonas* (Sager și colab., 1984).

Caracteristica generală care reiese din aceste observații aparent independente a fost aceea că, într-o contradicție netă cu noțiunile clasice privind *corelația genotip-fenotip*, presupusă a acționa în cadrul oricărui organism viu, trăsăturile controlate epigenetic (de la culoarea semințelor — la porumb și până la sexul unor insecte) pot fi definite nu de către secvența ADN, ci de către un anumit „mediu" al acestor secvențe sau genotip: o astfel de „conjunctură" stabilită deasupra secvenței ADN a fost „testată" de către alele ce controleaza trăsăturile menționate anterior, înainte ca ele să fie transmise ereditar, de către organismul în cauza. Deoarece secvența ADN a acestor alele a rămas neatinsă în acest proces de testare (Mc Clintock, Brink, Metz și Crouse nu știau acest lucru, în decursul studiilor lor de pionierat, dar azi este evident), s-a presupus realizarea unui cod diferit, al unei informații adiționale, denumită ulterior, informație epigenetică, diferită de cea genetică. Cu alte cuvinte, nu succesiunea bazelor într-o secvență primară a ADN ar reprezenta acest nou cod, ci succesiunea și distribuția unui **marker chimic** nou, în cadrul structurii secundare ADN.

O altă descoperire care a condus ulterior la conturarea domeniului aparte al epigeneticii a fost posibilă prin intermediul studiilor efectuate de către Mary Lyon, de la Medical Research Council din Anglia, în culturi celulare animale. Acestea au marcat, de altfel, începuturile (1961) cercetărilor de epigenetică la nivelul unei singure celule, și au avut drept model experimental gena ce controleaza culoarea blănii la șoarece. Rezultatele studiilor genetice ale cercetătoarei au fost combinate cu observațiile citologice anterioare ale lui Susumu Ohno, referitoare la compactarea unui cromozom X în așa-numitul „corpuscul Barr“ *(Barr body)* vizibil ușor în nucleul interfazic, prin densitatea sa particulară. Concluzia sa a fost aceea că o astfel de compactare este independentă de secvența ADN, având repercursiuni asupra întregului program de expresie genică codificat în cadrul cromozomului X. Astfel de eliminări de la program au loc în mod stabil în dezvoltarea unui organism și nu vizează anumiți cromozomi X, ci are loc aleator.

În anul 1975, pe baza unui număr suficient de date experimentale ca cele descrise anterior și raportate în literatură, au fost propuse modele privind modificări ale ADN care ar putea juca tocmai rolul de codificare a informației epigenetice, deja conturate. A.Riggs (de la City of Hope NMC, SUA) și, independent, Robin Holliday și J.Pugh (de la NIME, Anglia) au descris ipoteza implicării unui marker chimic deja cunoscut în cadrul structurii ADN: bazele minore sau metilate. Astfel, grupele metil ($-CH_3$) grefate pe inelele heterociclice ale bazelor azotate, deși lasă secvența sau succesiunea bazelor nemodificată, ar avea efecte majore asupra structurii secundare ADN și, prin acestea, asupra cromatinei, cromozomilor și, mai cu seamă, asupra programului de expresie genică, în regiunile genomice în care intervin.

Dintre bazele minore cunoscute, 5-metil-citozina s-a dovedit a avea, cel puțin până în prezent, rolul major în controlul epigenetic al numeroaselor trăsături studiate în domeniu. Natura și mecanismul acțiunii acestei baze modificate, aparent minore, după terminologia acceptată de la descoperirea sa, de către Chargaff (1955) într-un ADN extras din timus de vițel, dar cu repercursiuni majore asupra întregii dezvoltări și chiar evoluții a organismelor vii, reprezintă esența așa numitului domeniu al *„metilării ADN“* (Hollyday și Pugh, 1975; Riggs, 1975). La data enunțării ipotezelor de mai sus, rolul biologic propus pentru astfel de modificări a elucidat cu succes mecanismele de apărare a genomului gazdă bacterian, alcătuind componenta majoră a sistemului de modificare/restricție ce include ADN și endonucleazele de restricție bacteriene. Deși bazată pe un număr extrem de mic de date experimentale în domeniul eucariot, ipoteza enunțată a concordat însă surprinzător și cu unele proprietăți interesante ale 5mC în cadrul genomului complex, eucariot: pe de o parte, proeminența sa în cadrul structurilor ADN repetitive, iar pe de altă parte, toleranța manifestată de genomul eucariot, prin lipsa enzimelor reparatoare specifice. Astfel de proprietati fac din *5mC un adevărat marker chimic al informației epigenetice o posibilă* nouă informație pentru procesele vieții.

Prezența sa în genomul mamalian a fost, de altfel, demonstrată ulterior de către Adrian Bird și Edward Southern, care, în 1978, au pus la punct o metodă ingenioasă în acest sens. Curând după această realizare, Azim Surani (de la Welcome Institute, Anglia) și Davor Solter (de la Max Planck Institute, Germania) au raportat o observație experimentală cu consecințe remarcabile: prin transplant realizat la nivelul pro-nucleilor, ei au putut să demonstreze faptul că unirea artificială între informațiile genetice mascule (haploide) sau între cele femele (haploide) nu poate asigura dezvoltarea embrionară normală. Ipoteza care a rezultat s-a referit deci la contribuția celor două seturi cromozomale haploide la cariotipul final: aceasta trebuie să fie inegală, cel puțin pentru anumiți loci, necesari în timpul embriogenezei. Actualmente, efortul susținut al unui numar mare de cercetători a condus la elucidarea mecanismului prin care loci specifici din cadrul genomului mamalian sunt silențiati în mod stabil, specific liniei parentale (cu alte cuvinte, gameții femeli represează întotdeauna subsetul X, iar cei masculi, subsetul Y din cadrul genomului). Deoarece această represie este ireversibilă, până la următorul pasaj prin linia germinală, rezultă că un embrion ginogenetic sau androgenetic nu va putea funcționa pentru un subset X sau respectiv, Y; această combinație are efect letal, deoarece cel puțin una din copiile active ale fiecărei gene din ambele subseturi este necesară pentru dezvoltare. În consecință, a devenit clar faptul că fenomenul de *imprinting cromozomal*, descoperit de Helen Crouse, la genul *Sciara*, prezintă un analog apropiat din punct de vedere evolutiv în mamifere; există însă și o excepție definitorie pentru mamifere: imprintul specific parental nu se aplică întregului cromozom, ca la Sciara, ci domeniilor mai mici cromozomale sau chiar doar genelor individuale.

După un deceniu de achiziție a numeroase date experimentale, a fost posibilă demonstrarea legăturii funcționale dintre *nivelul de metilare al alelelor particulare și procesul de imprinting*. Una dintre observațiile cele mai convingătoare în acest sens a rezultat din studiul efectuat de grupul Dr.Timothy Bestor (de la Columbia University). Acesta a obținut șoareci transgenici, lipsiți de *enzima majoră responsabilă de menținerea stării metilate* a genomului (ADN metiltransferaza-1 sau *dnmt1*, de întreținere), care au murit din cauza incapacității de a controla căile epigenetice de inactivare a cromozomului X și de menținere a silențierii transcripționale în anumiți loci imprintați.

Grupul Dr.Rudolf Jaenisch (de la MIT) și cel al Dr. Shirley Tilghman (de la Princeton University) au reușit să disece numeroasele căi epigenetice de control al ultimelor două fenomene menționate. Încă o piesă importantă în așa-numitul *„puzzle"* al informației epigenetice a fost descoperită de către laboratorul Dr. Adrian Bird (de la Universitatea din Edinburgh): genomul mamalian conține câteva proteine importante, care ar lega foarte selectiv loci metilați de-a lungul macromoleculei ADN (Bird și Wolffe, 1999). Cercetările efectuate în laboratorul menționat și de către cel condus de Dr. Allan Wolffe (de la NIH, SUA) au arătat faptul că unele dintre aceste proteine sunt *represori transcripționali* puternici. Această represie ar fi bazată mecanicist pe formarea de *structuri locale cromatinice*, foarte specializate, inaccesibile factorilor de transcriere. Concluzia clară care a urmat unei astfel de ipoteze a fost aceea că astfel de structuri se pot propaga de-a lungul multiplelor runde de diviziuni celulare, determinând transmiterea informației epigenetice corespunzatoare.

Cu toate descoperirile menționate anterior sumar, este neîndoilenic faptul că domeniul epigeneticii a rămas încă obscur, inexplicabil în importante puncte ale sale, asteptând un progres adecvat al tehnicilor de monitorizare a dinamicii metilării ADN, de la nivelul general, genomic, la nivelul genelor, „in situ“.

4. MECANISMELE MOLECULARE ALE METILĂRII ADN

Metilarea ADN reprezintă un termen generic pentru procesele de **modificare a resturilor de baze azotate** (adenina, citozina, guanina) **din cadrul ADN.** Modificarea constă într-o reacție de alchilare (de adiție a grupei funcționale metil: -CH3) la nivelul bazelor azotate (a inelelor heterociclice). În urma reacției, gruparea metil substituie un atom de hidrogen, aflat inițial într-o legătură covalentă cu un atom de C, O sau N. Așadar, *metilarea este un proces de transformare a bazelor majore din macromolecula ADN în baze minore.*

Compusul metilat poate fi rezultatul unei interacții directe cu un *agent chimic alchilant* sau poate fi consecința unei *reacții enzimatice de transfer al grupei metil de pe un donor*, din cadrul celulei, denumită și „metilare biologică“. Cu alte cuvinte, metilarea poate avea loc în urma acțiunii unor agenti chimici alchilanti exogeni, în anumite condiții — *nefiziologice* — de reacție sau în urma acțiunii unei enzime specifice, endogene, în condiții naturale — *fiziologice*. În contextul acestei lucrări, privind **rolul biologic al fenomenului natural de metilare a ADN**, procesul biochimic, enzimatic, capătă, evident, importanță deosebită și, de altfel, neglijată până acum două decenii în urmă de cercetarea biologică și de cea genetică.

Conform unei clasificări actuale, formele cele mai comune ale metilării ADN produse într-o **activitate chimică** sunt reprezentate de O6-metilguanina și derivatii săi, iar cele produse în urma **activității enzimatice** sunt: N6-metiladenina, N4-metilcitozina și 5-metilcitozina. Confuziile care pot persista, în prezent, au la bază faptul că, relativ la cele două tipuri de activități (chimică și biologică), se cunosc două tipuri de enzime diferite. Astfel, în cadrul proceselor de *reparare* a resturilor de ADN alchilate *chimic* acționeaza o categorie aparte de ADN metiltransferaze, ce include enzima mamaliană **O6-metilguanin-ADN-metiltransferaza** (ADN metiltransferaza **de reparare**) (Laird și Jaenisch, 1996). Cu toate că alchilarea chimică și rolul enzimei respective reparatorii s-au dovedit a fi deosebit de relevante în carcinogeneză, acest proces este în mod uzual tratat separat de procesul natural, observat în ADN eucariot, respectiv, producerea enzimatică a bazelor minore menționate anterior.

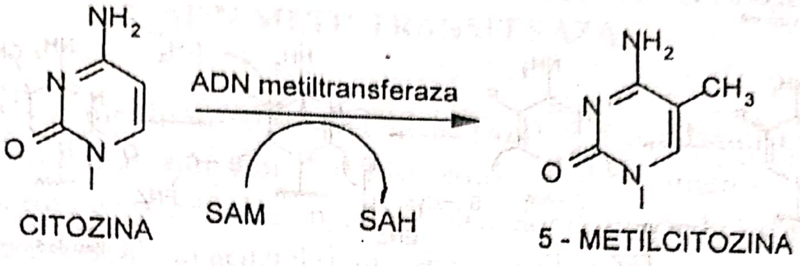


Fig. 1 — Reacția 1 de metilare a citozinei

O moleculă cheie a procesului **biochimic** de metilare a ADN este, în mod cert, **ADN metiltransferaza** (ADNMTaza), enzimă cu rol de **catalizator al reacției de transfer al grupei metil** din cadrul structurii unei molecule „donor", în structura heterociclului de bază azotată ("substrat") (Fig. 1).

Dintre bazele azotate metilate biologic, **5-metilcitozina (5mC)** este frecvent detectată în spoturile cheie ale secvențelor de *reglaj genic*, fapt pentru care a fost sugerată ideea implicării sale în **funcționarea nivelului informațional epigenetic.** S-a dovedit, totodată, că astfel de situsuri sunt purtătoare ale unui **potențial mutagen** important: în anumite condiții structurale și funcționale ale ADN, *modificarea minoră* (C-5mC) are capacitatea de a se transforma într-o *modificare majoră* dramatică, a însăși secvenței de baze, prin *tranzițiile* C-U-T, acestea din urmă determinând alterări esențiale în **funcționarea nivelului informațional genetic.** Apariția acestor tipuri de mutații sunt datorate fie deaminării spontane (favorizată de temperatură) a citozinei sau a 5-metilcitozinei, fie deaminării enzimatice, catalizate de aceeași ADN (citozin-5)-metiltransferază, însă în condiții specifice de reacție.

Explicarea acestor procese la nivelul molecular, cât și a rolului biologic, pe care natura l-a avut în vedere în evoluția unor astfel de modificări, este fundamentată în cele ce urmează, pe considerentele privind:

(i) reacția biochimică complexă de metilare a substratului reprezentat de citozina în cadrul ADN;

(ii) efectul introducerii grupelor metil asupra *structurilor* primare, secundare și suprastructurilor ADN, ca *macromoleculă liberă*, pe de o parte, și sub formă de *complex nucleoproteinic, caracteristic fibrei cromatinice*, pe de altă parte;

(iii) efectul metilării ADN, la nivel *cromozomal.*

Rezultatele cercetărilor privind mecanismul molecular al metilării citozinei în cadrul ADN din acest domeniu au condus la elucidarea unei serii de fenomene observate în studiile citogenetice asupra materialului cromatinic, corelate cu starea patologică și normală, la organismele complexe eucariote.

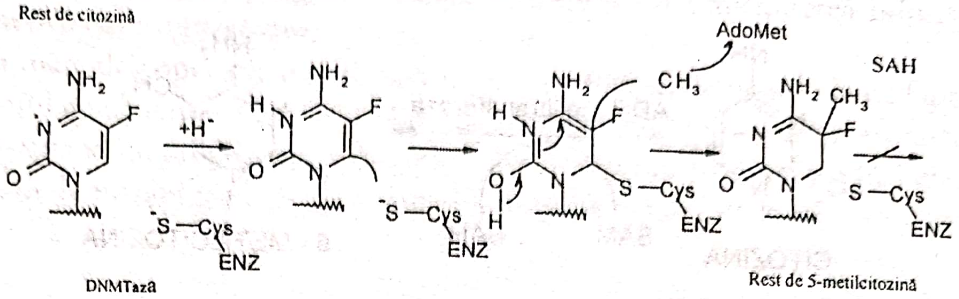


Fig. 2 — Mecanismul reacției de transfer a grupei metil (-CH3) catalizată de ADN metiltransferaza. AdoMet sau SAM -S-adenozil-metionina, donorul grupelor metil, S-Cys-Enz – enzima ADNMTaza, în cadrul căreia se evidențiază gruparea cisteină activă în legarea C_6 al inelului pirimidinic, SAH-S-adenozin homocisteina, unul din produșii reacției, obținut prin activitatea de donor a SAM.

5. ENZIMOLOGIA METILĂRII ADN

Reacția biochimică de metilare a citozinei

Metilarea ADN este o reacție enzimatică de introducere a grupei metil (-CH3) în poziția C-5 a inelului pirimidinic al citozinei (fig. 1). Reacția este catalizată de *enzima* ADN (citozina-5)-*metilransferaza* (EC 2.1.1.37) (ADN MTaza sau MTaza).

Acțiunea enzimatică presupune următoarele etape (Laird și Jaenisch, 1996; Smith și colab.1994):

(i) *recunoașterea și legarea* specifică a celor două componente esențiale ale reacției de metilare enzimatică (fig.2);

substratul — citozina (în cadrul structurii sale, pH-ul acid determină redistribuirea efectelor electronice, cu favorizarea unui *atac nucleofil în poziția C-5*) și

donorul de grupe metil — S-adenozil metionina (AdoMet sau SAM), la nivelul căruia are loc *labilizarea specifică a legăturii* implicând grupa -CH3;

(ii) *clivarea și transferul* -CH3 din structura donorului, în poziția C-5 a inelului pirimidinic;

(iii) *stabilizarea legăturii covalente formate* într-o nouă structură (5-metilcitozina), eliberarea S-adenozil homocisteinei (SAH) și a enzimei.

6. MECANISMUL MOLECULAR DE ACȚIUNE A ENZIMEI ADN METILTRANSFERAZA

Enzima ADN metiltransferaza (ADN MTaza) și mecanismul molecular al transferului prezentat anterior au fost studiate de numeroși cercetători, informațiile obținute vizând soluționarea problemelor disputate în legatură cu *rolul biologic al metilării ADN*, în general și, în speță, cu utilizarea enzimei în *metodologia de modulare a nivelului metilării* ADN, în diferite sisteme eucariote.

Acțiunea enzimei a fost mult timp dezbătută, datorită descoperirii multiplelor sale fațete. S-a observat, astfel, că MTaza poate „alege", în anumite condiții, o anume **specificitate de substrat**, ca și o anume **specificitate de reacție.** Ca urmare, se încearcă, actualmente, caracterizarea enzimologiei metilării, fie pe baza unui set de enzime cu activitate MTazică (în cadrul căruia, fiecare componentă manifestă o anume specificitate de reacție sau de substrat), fie presupunându-se existența unei enzime unice, ce prezintă flexibilitate structurală și, deci, funcțională (sugerându-se, prin aceasta, faptul că MTaza poate adopta o anume preferință pentru un anumit substrat sau faciliteaza o anume reacție enzimatică, în funcție de condițiile specifice de reacție).

Recent, s-au propus modele bazate pe un ancestor comun al genei pentru MTaza pro- și eucariotă, care, prin prelucrări specifice ale intronilor și permutații ale domeniilor funcționale specifice din cadrul structurii polipeptidice ale enzimei, ar fi condus la **izoforme** diferite ale acesteia (Trautner, 1999). Evoluția izoformelor enzimei MTaza s-ar baza pe necesitățile de reacție impuse de un anumit stadiu al interacției organismului respectiv sau a celulei respective cu mediul. Ultima ipoteza pare ar fi în acord cu multiplele alternative pe care natura le-a considerat propice în sensul economiei de energie, dar, în același timp, al adaptabilității maxime la anumite condiții de mediu.

6.1 Specificitatea de reacție

Mecanismul de acțiune a MTazei procariote a fost propus inițial de către Santi (Santi și colab.1983; Wu și Santi, 1987). Ulterior, Selker (1990), pe baza acelorași mecanisme, propune caracterizarea MTazei eucariote pornind de la corelația între K_M-ul reacției și **activitatea metilazică sau deaminazică** a enzimei. Recent, grupurile Chen și colab. (1991), Shen și colab.(1992) au prezentat caracteristici ale structurilor primare (secvența de aminoacizi) și suprastructurilor polipeptidice corespunzatoare ADN MTazei, încercând, totodată, să discute anumite corelații dintre acestea și activitatea enzimei.

Autorii menționați au demonstrat faptul că *legătura covalentă formată între ADN (citozina-5)-metiltransferaza și C-6 de pe inelul pirimidinic al citozinei* (fig. 2), *ca și concentrația donorului (SAM)* de grupe metil sunt de importanță crucială în desfășurarea reacției enzimatice: din reacție pot rezulta, astfel, doi produși pirimidinici distincți.

Alegerea căii de metilare sau de deaminare se realizeaza pe baza accesibilității donorului de metil :

(i) nivelurile **SAM** cu sau peste valoarea K_M corespunzatoare enzimei conduc la modificarea rapidă a citozinei țintă și la obținerea **5mC** (fig.3 — reacțiile 1-2-3);

(ii) dimpotrivă, când nivelurile SAM sunt limitative, poate avea loc deaminarea citozinei la **uracil** (fig.3 — reacția 5).

Majoritatea studiilor efectuate până în prezent au vizat ADN-MTazele din sistemul procariot. Acestea au demonstrat faptul că tranzițiile C-U-T pot fi facilitate de însăși ADN (citozin-5)-metiltransferaza sau de acțiunea acesteia combinată cu

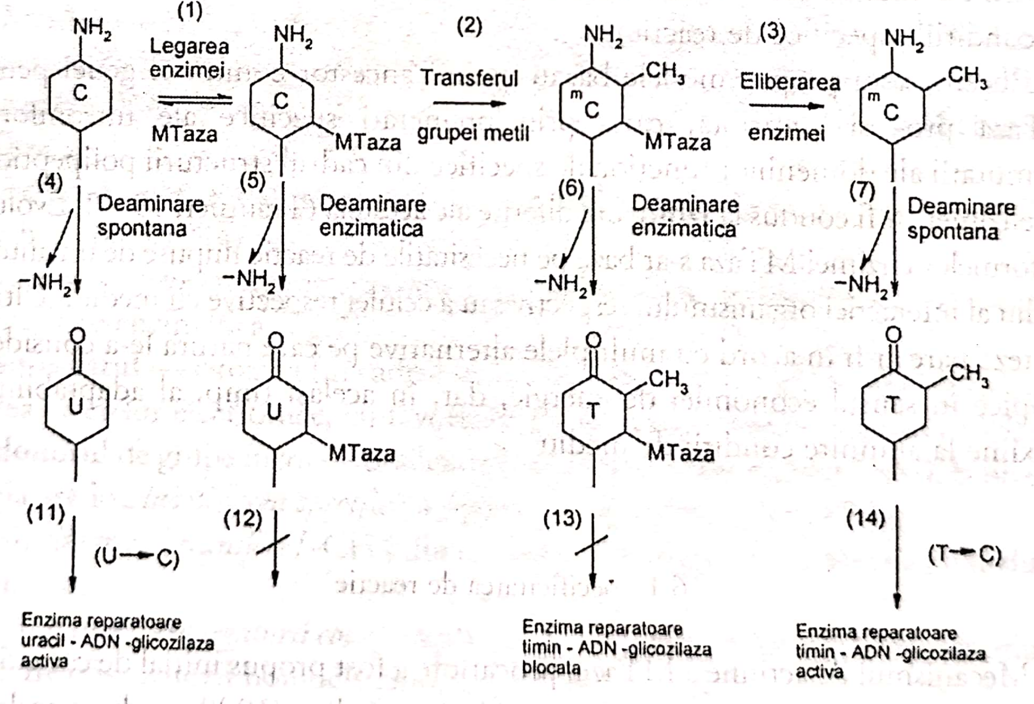

(1)
Legarea enzimei
MTaza
(2)
Transferul grupei metil
(3)
Eliberarea enzimei
NH_2
C
MTaza
^mC
CH_3
(4)
Deaminare spontana
(5)
Deaminare enzimatica
(6)
Deaminare enzimatica
(7)
Deaminare spontana
$-NH_2$
O
U
T
(11)
(U→C)
(12)
(13)
(14)
(T→C)
Enzima reparatoare uracil - ADN -glicozilaza activa
Enzima reparatoare timin - ADN -glicozilaza blocata
Enzima reparatoare timin - ADN -glicozilaza activa

Fig. 3 — Reacții biochimice în cadrul cărora este implicat substratul – rest de citozină – și enzima-ADN metiltransferaza. Sunt evindențiate activitățile diferite ale enzimei, produșii de reacție (1-7) corespunzători și activitățile enzimatice reparatorii din cadrul sistemelor eucariote.

acțiunea altor enzime (reparatoare), prin următoarele căi de reacție (Laird și Jaenisch, 1996):

(i) deaminarea citozinei (reacția 5, fig.3);

(ii) deaminarea 5mC (reacția 6, fig.3);

(iii) blocarea reacției de reparare a uracilului (produsul reacției de deaminare a citozinei) (reactia 12) și blocarea reacției de reparare a timinei (produsul reacției de deaminare a 5-metilcitozinei), prin intermediul timin-ADN-glicozilazei (reacția 13, fig.3);

(iv) metilarea uracilului, reacție din care rezultă timina (reacția 15)

sau de o combinație între aceste mecanisme.

Deoarece se presupune că toate ADN MTazele utilizează un mecanism de reacție comun (Cheng, 1995; Kumar și colab., 1994; Roberts, 1995; Schluckebier, 1995; Wu și Santi, 1987), acesta a fost extrapolat și la enzima eucariotă — mamaliană sau vegetală: ea poate, deci, contribui la rata mare a tranzițiilor observate frecvent în dinucleotidele CpG, la organismele superioare.

Capăt N-terminal	Regiunea de legare a SAM	Regiunea catalitică	Regiunea de recunoaștere a țintei	Capăt C-terminal

Fig.4 — Diagrama domeniilor funcționale ale enzimei ADN metiltransferaza. Regiunea catalitică conține grupe active SH- apartinând aminoacidului cisteina (Cis).

Datele privind **structura enzimelor ADN MTaze** (pro- și eucariote) atestă prezența unei secvențe absolut conservate, **Pro-Cis** (prolina-cisteina) (Bestor și colab., 1988; Lauster și colab. 1989; Posfai și colab. 1989), la toate ADN MTazele cunoscute până în prezent. În contextul interacției cu inelul pirimidinic, *grupele tiol* ale cisteinei au rolul de *nucleofile catalitice*, ce conduc la formarea unei legături covalente cu **C-6** al acestui inel (Wu și Santi, 1987) și obținerea unui **intermediar dihidropirimidinic, nearomatic** (fig.2).

Studiul acestui complex intermediar a elucidat numeroase aspecte contradictorii referitoare la **potențialul mutagen sau doar epigenetic** al enzimei. Astfel, s-a constatat că structura dihidropirimidinică poate fi, ulterior, *alchilată în poziția C-5*, cu grupa metil donată de SAM. În urma acestei reacții de *transfer* se obține SAH și, totodată, se eliberează proteina din complexul inițial, pentru a se forma **5-metilcitozina.** Dimpotrivă, în cazul în care nivelul SAM este limitant, grupa C-4 amino devine labilă, permițând *deaminarea* intermediarului și formarea uridinei, deci, favorizarea directă a **mutației de tranziție: C—-U.**

Interacția MTazei HhaI cu ADN, în *absența SAM,* a fost studiată de Wu și Santi (1987), care au arătat faptul că enzima se leagă de ADN, cauzând un schimb rapid de protoni cu apa, în poziția C-5 a inelului pirimidinic. Rezultatele au fost interpretate ca fiind datorate formării reversibile a intermediarului nearomatic dihidropirimidinic, discutat anterior. Cunoscându-se faptul că, în baza liberă (citozina), reducerea dublei legaturi C5=C6 determină creșterea vitezei reacției de deaminare cu un factor de 10^4 (Selker, 1990), s-a tras concluzia generală privind *favorizarea reacției enzimatice de deaminare a citozinei la uridină, de către absența SAM.*

În concluzie, acțiunea naturală a ADN metiltransferazei eucariote sau procariote poate fi orientată, în funcție de condițiile de reacție, către o modificare epigenetică, respectiv, transferul grupei metil pe heterociclul restului de citozina, sau către o mutație de tranziție (modificare genetică): aceasta poate fi de tipul C-U sau mC-T.

Astfel, s-a constatat că o *ADN MTază procariotă, având o mutație în cadrul domeniului său de legare a SAM, este capabilă să acționeze ca o enzima mutagenă* (Shen și colab., 1995). Deși nu s-au obținut, încă, dovezi directe ale unui comportament identic la MTaza eucariotă, experimentele bazate pe influența dietei deficiente în substante donoare de grupe metil asupra mutagenicității enzimei sunt, deocamdată, un indiciu clar al implicării acesteia, printr-un mecanism asemănător, în carcinogeneză.

6.2. Specificitatea de substrat

Informațiile referitoare la creșterea nivelului de metilare în moleculele de ADN cu un conținut ridicat în secvențe de tipul (5’)CpG(3’) au condus la ipotezele inițiale — referitoare la specificitatea de substrat a enzimei ADN (citozina-5)-metil transferaza. Acestea au indicat faptul că, *în cadrul ADN eucariot, resturile de citozină modificată sunt întotdeauna localizate lângă resturile de guanină, pe aceeași catenă, în cadrul secvențelor de tipul (5’)CpG(3’), unde p reprezintă legătura 3’-5’ fosfodiesterică dintre nucleotidele adiacente.* Această preferință se explică prin structura specifică a secvențelor repetate Pu-Py, care determină răsucirea inelului pirimidinic într-o poziție extrahelicală, accesibilă acțiunii enzimei (fig.3).

La ADN provenit de la **animale (vertebrate)**, 5mC s-a detectat cu precădere în secvențe **5mCpG**. Studiile comparative inițiale ale moleculelor de ADN extrase din diferite surse animale au relevat următoarele *reguli de distributie intragenomică a situsurilor 5mC* (Romanov și Vanyushin 1981):

(a) la toate speciile de animale studiate, genomul a fost metilat neuniform, un numitor comun al tuturor regiunilor metilate fiind reprezentat de 5mC: restul de citozină metilată a fost prezent în toate tipurile de secvențe nucleotidice cu un *anumit grad de repetiție*;

(b) dinamica metilării acestor situsuri a fost caracterizată astfel: cea mai mare cantitate de 5mC este găsită în secvențele înalt repetitive, cum sunt palindroamele și ADN satelit, în timp ce secvențele unice sunt cel mai puțin metilate;

(c) în cadrul secvențelor moderat repetate, în diferitele fractii, s-a constatat o variatie a gradului de metilare. Aceste caracteristici ale metilării genomului la vertebrate au fost verificate prin determinarea distribuției intragenomice a secvențelor **CpG(5mCpG)** (Romanov și Vanyushin 1981).

Numeroase alte date experimentale au dovedit că metilarea ADN la animale *nu are loc numai în secvențele CG.* Astfel, la ADN de **soarece**, 5mC a fost detectată în toate secvențele dipirimidinice conținând citozina, inclusiv **5mCp5mC** (Vanyushin, 1984). Sneider (1980) menționează faptul că s-a izolat dinucleotida **5mCpT**, din ADN de celule de hepatom Novikoff și că, în cadrul acestui tip de ADN, 5mC s-a detectat nu numai în secvențe **Cp5mCpGpG**, dar și în secvențe **5mCpCpGpG**. În ADN extras din globina **umană**, 5mC a fost localizată în secvențele **5mCpCpGpG sau 5mCp5mCpGpG** (van der Ploeg și Flavell 1980).

Tot la mamifere, s-a detectat o activitate a unei MTaze cu specificitate mare pentru secvențe repetitive ale C, însă diferite de cele dinucleotidice descrise anterior (CpG)(Clark, și colab., 1995). Acestea pot forma suprastructuri în forme specifice de tip „ac de păr“ (*hairpain*), ușor recunoscute de MTaza, cu care pot da naștere la interacții stabile. Actualmente, există păreri, conform cărora așa-numitul „*slippage*“ replicativ, prin care crește sau scade numărul de repetiții ale unei anumite secvențe (fenomen deosebit de mult speculat în *screening*-ul populațional și în cazul detecției purtătorilor de premutații în gena FMR1, corelată cu fenomenul X fragil), ar avea la bază astfel de mecanisme ce conduc către mutații.

În prezent, numeroase studii de secvențiere a genomului eucariot au dovedit prezența așa-numitelor **insule CpG**, care prezintă un rol din ce în ce mai recunoscut în dezvoltarea organismelor eucariote. Acestea sunt **nemetilate** la organismele dezvoltate **normal**, metilarea ducând la devierea programului genetic către patogeneză sau chiar cancerogeneză (Clark și Wall 1996).

Toate aceste tipuri de situsuri pot sugera existența, în celula mamaliana, a unui

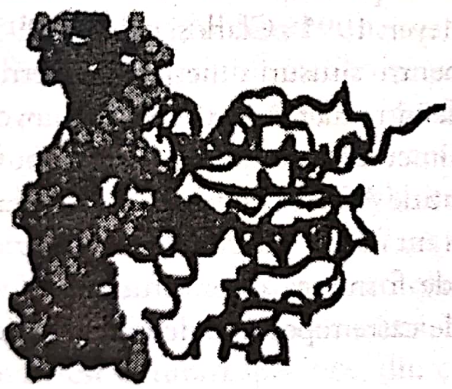


Fig. 5 — Structura moleculară a complexului ADN dublă elice (schelet glucid-fosfat / bazele azotate / restul de citozină răsucit către exterior) – ADN MTaza (domenii funcționale în formă de panglici, acționând asupra restului de citozină) (după Smith, 1998).

sistem multicomponent al enzimei ADN metilaza, care prezintă *numeroase situsuri de recunoastere.* În sprijinul acestei idei a fost adus argumentul bazat pe descoperirea unui tip diferit de ADN metilază în nucleii limfocitelor izolate de la vacile suferinde de limfoleucoza cronică; activitatea sa nu se aliniază din punct de vedere al proprietatilor fizico-chimice și al situsurilor de recunoaștere la cea caracterizată în limfocitele normale (Vanyushin, 1984).

La ADN din **plantele superioare** s-a constatat că doar o fracție mică din 5mC este localizată în secvențe de tipul 5mCpG, o cantitate esențială, în schimb, fiind detectată în *mijlocul sau la capetele 5' ale oligonucleotidelor pirimidinice* (Vanyushin 1984). Astfel, în ADN extras din porumb, 5mC s-a detectat în: (i) secvențele: **Pu-5mC-Pu, 5mCpT și 5mCp5mC**, și, de asemenea, (ii) trinucleotidul **CpCpC**, în care, câte două resturi de citozină sunt metilate (Kirnos și colab.1981). Totodată, un grad înalt de metilare a citozinei (80%) a fost întâlnit și în secvențele trinucleotidice de tipul **CXG** (CAG și CTG), izolate din ADN de germeni de porumb (Gruenbaum și colab.1981), dovedite actualmente, și în numeroasele secvențieri ale genomului vegetal manipulat genetic (Meyer și colab.1995).

7. SIMETRIA SITUSURILOR METILATE ÎN DUBLA ELICE ADN

Ipotezele inițiale au sugerat faptul că procesul de metilare are loc simetric, în situsuri de tipul: CpG. Datele recente au demonstrat prezența metilării și în situsuri nesimetrice de tipul trinucleotidelor CpNpG (Meyer, 1995 ; Clark și colab., 1995).

Discuția preferinței manifestate de enzimă pentru situsuri simetrice/asimetrice poate avea ca punct de pornire tipul activității:"de întreținere", respectiv, „de novo". Dacă prima activitate necesită un substrat hemimetilat și conduce la o distribuție simetrică a situsurilor metilate pe cele două catene de ADN, cea de a doua activitate se desfasoră pe un substrat complet nemetilat și nu necesită secvențe caracterizate prin simetrie. Aceasta din urmă este inițiată de formarea unor structuri ADN neobișnuite, posibil în formă de „ac de par", de către repetițiile de trinucleotide (CAG, CGG etc.).

Atât la mamifere, cât și la plante s-au detectat, prin secvențierea ADN, situsuri asimetrice, care, împreună cu cele simetrice, fac parte din substratul de actiune a MTazei în controlul expresiei genice.

S-a sugerat că în plantele superioare ar acționa *ADN metilaze (ADN MTaze) diferite* (Vanyushin 1984), care metilează citozina în secvențe cu cel puțin *două tipuri diferite de simetrie,* fapt dovedit a fi valabil și pentru sistemul mamalian.

Gradul de metilare al dublei elice ADN poate fi ADN nemetilat, ADN hemimetilat sau ADN complet metilat.

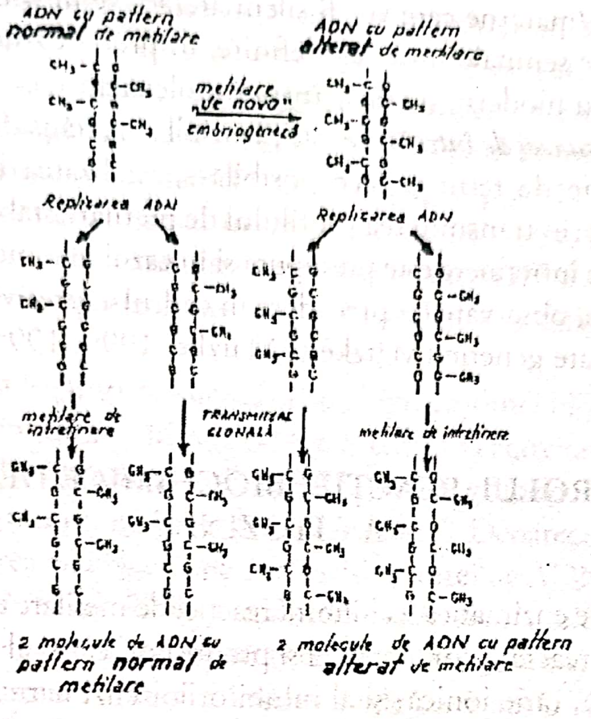

ADN cu pattern normal de metilare
ADN cu pattern alterat de metilare
metilare „de novo"
embriogeneză
Replicarea ADN
Replicarea ADN
metilare de întreținere
TRANSMITERE CLONALĂ
metilare de întreținere
2 molecule de ADN cu pattern normal de metilare
2 molecule de ADN cu pattern alterat de metilare

Fig. 6 — Reacții postreplicative de metilare a citozinei catalizate de ADN metiltransferaza „de întreținere" și respectiv „de novo"; se evidențiază substratul specific pentru fiecare activitate în parte: ADN hemimetilat, respectiv, nemetilat.

Una din problemele majore ale domeniului metilării ADN se referă la diferențierea acțiunii metilazice pe baza *semnalelor* atribuite fie (i) grupelor *metil* de pe catena matriță (ADN dublu-catenar fiind, în acest caz, hemimetilat), fie (ii) *factorilor vag definiți*, care activează metilarea catenelor complet nemetilate. Cele două acțiuni au fost atribuite, inițial, unor enzime diferite, denumite, după specificitatea de substrat, **metilaza de întreținere** și, respectiv, **metilaza „de novo"**. De asemenea, au existat păreri conform cărora cele două activități ar putea fi desfășurate de către o aceeași enzima, în condiții de activare diferite și prin intermediul unor restructurări specifice, din cadrul complexului polipeptidic al acesteia.

Metilaza de întreținere acționează specific pe un substrat *hemimetilat*, respectiv, pe dublu-catene de ADN, în care doar una dintre catene este metilată; metilaza „de novo" acționează, după cum indică și denumirea, pe un substrat complet *nemetilat* de ADN (fig.5) (Razin, 1984).

Acțiunea *metilazei „de novo"* este presupusă în etapa timpurie a *embriogenezei*, în scopul stabilirii programului epigenetic de expresie spațio-temporală, necesar tuturor genelor în decursul dezvoltării normale a unui organism complex eucariot. În această etapă, activitatea sa este coordonată de semnale care indică alegerea precisă a genelor paterne/materne care vor fi silențiate/active în genomul individului în formare. Astfel de semnale sunt vag definite, în prezent studiul lor făcând parte dintr-un domeniu modern, de **imprinting** molecular.

Activitatea *metilazei de întreținere* este plauzibilă în „transmiterea clonală“ (fig.5); ea are specificitate de țesut și face posibilă specializarea țesuturilor în cadrul *citodiferențierii* , prin transmiterea profilului de metilare stabilit în embriogeneză. Tot o activitate de întreținere este presupusă și în cazul fenomenelor de paramutație și trans-inactivare, observate cu precădere în cadrul expresivității transgenelor, la plantele manipulate genetic (Matzke și Matzke, 1990, 1995).

8. CONTROLUL REACȚIEI BIOCHIMICE DE METILARE A CITOZINEI

Ca orice reacție enzimatică, echilibrul reacției de metilare este supus controlului prin intermediul reactanților, enzimei și produșilor, cât și al condițiilor de mediu (pH, temperatură, tărie ionică) și al inhibitorilor enzimatici.

Se presupune că **SAH** eliberat din reacție — în urma donării de către SAM a grupei metil — atacă situsul MTazei de legare a donorului SAM, cu o afinitate mai mare decât aceasta din urmă (Wu și Santi, 1987); pe această cale se inhibă legarea SAM la MTază și deci desfășurarea reacției de metilare a citozinei. Rezultatele descrise de numeroși cercetători au demonstrat faptul că SAH este un inhibitor al activitații mutagene (deaminazice) desfășurată de MTază (probabil, datorită stabilizării legăturii C-4 — NH_2), acțiunea sa inhibitorie fiind dependentă de concentrație (inhibiția începe la nivelul 3nM și este maximă la nivelul 3ìM).

De asemenea, în cadrul experimentelor de manipulare genomică la plante, în cultură „in vitro“ a tesuturilor și celulelor vegetale, respectiv, în experimentele de embriogeneză somatică, s-a observat faptul că metilarea citozinei interferă cu calea metabolică de *sinteză a etilenei*, prin intermediul **SAM** (Okkels, 1998; Brown, 1989). Nivelul acestuia din urmă determină activarea uneia sau alteia din caile alternative, asigurând, astfel, o flexibilitate mai mare genomului și metabolismului vegetal, comparativ cu al celorlaltor eucariote superioare (acestea tolerând nivele mult mai scăzute ale variației nivelurilor metilării ADN sau SAM).

Activitatea enzimei a fost speculată în numeroase abordări ale problematicii metilării ADN la eucariote. Una dintre metodele cele mai eficiente este cea de **inhibare a activității MTazei** „in vitro“ sau „in vivo“, prin acțiunea unor analogi ai resturilor de citidina (5-azacitidina, 5-azadeoxicitidina) (Jones și Taylor, 1980, 1981).

Acțiunea **5-azacitidinei** (5-azaC) a fost descoperită în experimentele de elaborare a strategiilor de tratare a diferitelor tipuri de cancer. Mai cu seamă în cazurile de leucemii, s-a utilizat tratamentul cu citostaticul 5-azaC, observându-se frecvent activarea întâmplătoare a unor gene, care, în mod normal, erau silențiate.

Mecanismul inhibiției exercitate de acest analog asupra MTazei se bazează pe încorporarea sa, în prealabil, în cadrul macromoleculei ADN, în locul citozinei; o astfel de substituție nu alterează interacția enzimei cu ADN și situsurile specifice de legare, ci determină, formarea de legături covalente, stabile, între enzimă și analog.

Fixarea MTazei în legături covalente cu analogii citidinei blochează înaintarea ei pe catena polinucleotidică și, în consecință, întreaga sa activitate metilazică ulterioară: molecula de ADN rezultată va fi, astfel, lipsită de grupele metil, fapt ce determină declanșarea așa-numitului proces de *„demetilare"*. Deoarece, acesta din urmă are la bază încorporarea analogului pe parcursul sintezei de ADN, *astfel de metode nu sunt posibile decât în condițiile unei rate mari de diviziuni celulare, deci în culturi stabile de celule sau țesuturi* (Christman și colab.,1980; Jones și Taylor, 1981).

În numeroasele sisteme studiate, tratamentele cu 5-azaC au condus, inițial, la **activarea unor gene silențioase** și la expresia lor ulterioară (Groudine și colab., 1981; Jones și colab., 1981). Articolul original care a raportat proprietatea de activator de gene a 5-azaC a descris activarea unui set complex de funcții celulare, care a condus la diferențierea „in vitro" a fibroblastelor de soarece, în celule de mușchi (Constantinides și colab., 1977). Studiul mecanismului de implicare a acestui agent în procesul de activare a anumitor gene a relevat faptul că acțiunea sa se bazează pe blocarea enzimei în timpul replicării, ceea ce determină *demetilarea pasivă a ADN în anumite secvențe.*

Elucidarea structurii și a mecanismului de acțiune a acestei substanțe de sinteză, a condus la concluzia că, prin încorporarea sa într-o catenă nou sintetizată de ADN, urmată de legarea ireversibilă la MTaza, 5azaC poate inhiba activitatea enzimatică de metilare și, prin aceasta, evident, conduce la demetilarea ADN (Hepburn și colab.198 7; Jones 1984). Această descoperire a determinat dezvoltarea extraordinară a domeniului metilării ADN, facilitând urmărirea efectelor *demetilării* în procesele de diferențiere/dediferențiere în *culturile „in vitro"*, atât în sistemul vegetal, cât și în cel mamalian .

9. METILAREA ADN ȘI CANCERUL

O părere inițială considera cancerul, în esență, drept o boală genetică, fiind indusă de o serie de modificări la nivelul ADN, produse în linia germinală și/sau somatică. Cercetările recente au inclus aceste modificări atât în cadrul *Epigeneticii*, cât și al *Geneticii*. Metilarea ADN implică o modificare covalentă a ADN care influențează o varietate de procese ce afectează integritatea și funcția acestuia. S-a speculat, în consecință, timp îndelungat, că metilarea ADN ar juca un anumit rol în inducerea sau progresia canceroasă.Totodată, s-a demonstrat faptul că *aceeași enzimă care catalizează metilarea biologică poate deveni, în anumite condiții, mutagenă, producând mutații de tranziție, caracteristice tumorilor (C-T).*

În ultima decadă s-au obținut numeroase date experimentale care confirmă această părere, bazându-se, pe de o parte, pe modificări variate în cadrul *pattern-ului de metilare al ADN* și, pe de altă parte, pe variația *expresiei ADN MTazei din cadrul celulelor transformate* „in vitro“ și „in vivo“. O idee acceptată, în prezent, privind aceste date, ar fi corelarea cancerului cu o hipometilare generală, concomitent cu o hipermetilare locală și o creștere substanțială a activității MTazice (Szyf, 1995, Laird și Jaenisch, 1996).

La acest remarcabil pachet informativ se adaugă recentele descoperiri ce dovedesc în mod direct legătura cauzală dintre metilarea ADN și cancer. Acestea se referă, în speța, la efectul metilării ADN asupra conformației cromatinice, la flexibilitatea activității ADN MTazei (enzimă ce poate cataliza fie o reacție de transfer de grupe metil, fie de deaminare) și, mai cu seamă, la mecanismul de interacție a acestei enzime cu anumite substrate de ADN, ce o face capabilă să recunoască și să marcheze specific, prin metilare/demetilare situsuri critice.

Actualmente este în mod clar dovedit faptul că ADN MTaza poate genera mutațiile de tranziție C-T în situsuri considerate *„pete fierbinți“* ale mutagenezei: repetițiile dinucleotidului CpG sau ale trinucleotidelor CpNpG, caracteristice tumorilor (Laird și Jaenisch, 1996).

Metilarea ADN este implicată în cancerogeneză.

Tabloul complex al funcției metilării ADN în dezvoltarea normală și patologică la mamifere, în general și la oameni, în particular, este descrisă în diferite lucrări de specialitate (Laird și Jaenisch, 1996; Counts și colab., 1995).

După cum s-a aratat anterior, o *dezvoltare normală* implică funcționarea corectă a reacției enzimatice de metilare a ADN, respectiv, menținerea unui *echilibru* între transmiterea (*întreținerea*) și *variația* pattern-urilor de metilare specifice de țesut. Primul este atribuit combinării armonioase ale celor două proprietăți amintite (fidelitate și flexibilitate) ale sistemului ADN MTazic „de întreținere“ și, posibil, „de novo“; prin acestea, fenomenul de **transmitere clonală** se integrează perfect în domeniul *epigenetic*, specific procesului metilării. Cel de-al doilea proces este posibil datorită potențialului *mutagen* al MTazei, cât și al situsurilor CpG metilate sau chiar nemetilate. Evident, tranzițiile de baze care pot astfel să ia nastere

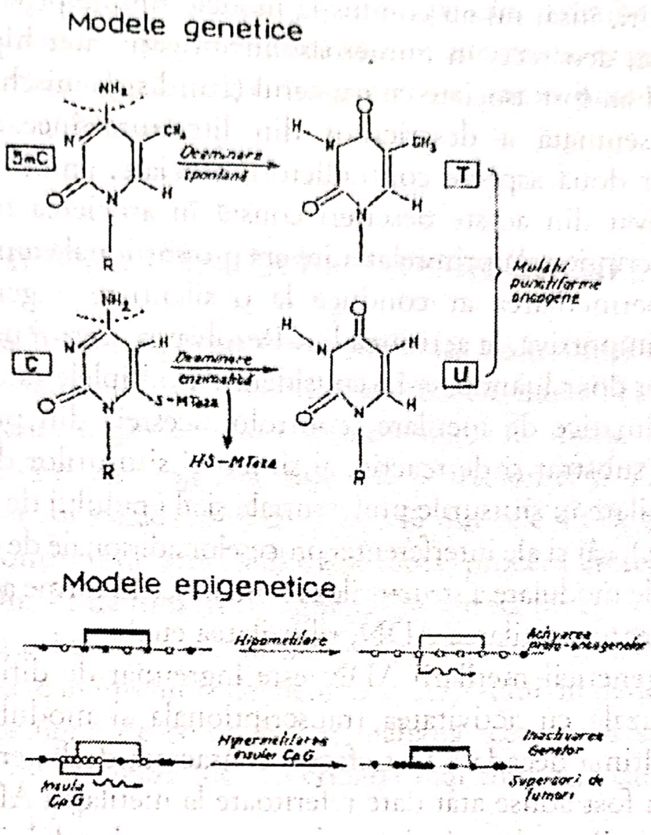

Modele genetice
5mC
Deaminare spontană
T
C
Deaminare enzimatică
S-MTaza
HS-MTaza
U
Mutații punctiforme oncogene
Modele epigenetice
Hipometilare
Activarea proto-oncogenelor
Hypermetilarea insulei CpG
Insula CpG
Inactivarea genelor
Supresori de tumori

Fig. 7 — Mecanisme genetice și epigenetice în cancerogeneză.

determină modificări *genetice*, ce alterează structura primară a genelor, determinând fenomenul opus celui amintit anterior, de **variație clonală**.

Cele două **mecanisme - epigenetic și genetic** - reprezintă elementele cheie ale procesului evolutiv ce deviază programul unei celule *somatice*, către un program transformant, de celule *maligne* (fig.7). Natura semistabilă a activității ADN MTazei, care, în anumite condiții poate să treacă de la o activitate de întreținere, la una „de novo“ sau de la o activitate transferazică, la una de deaminare, asigură optimizare pentru *rolul metilării ADN în oncogeneză, prin intermediul ambelor căi: genetică și epigenetică*.

10. ROLUL EPIGENETIC AL METILARII ADN ÎN CANCER

Modificări globale în nivelurile de metilare, ale activității ADN MTazei, cât și modificările din cadrul pattern-urilor de metilare din genele individuale au fost considerate a fi drept trăsături caracteristice unei varietăți mari de celule tumorale.

Aceste descoperiri, însă, nu au condus la modele simple privind rolul metilării în carcinogeneză, deoarece, în numeroase investigații, atât **hipo-**, cât și **hipermetilarea** ADN au fost asociate cu cancerul (Laird și Jaenisch, 1996).

O parte însemnată a descrierilor din literatură încearcă, actualmente, concilierea celor două aspecte contradictorii asociate, ambele, cu oncogeneza. **Paradoxul** derivat din aceste descrieri constă în asocierea metilării ADN cu activitatea transcripțională prin relația invers proporțională amintită anterior. În acest mod, hipermetilarea ar conduce la o silențiere a genelor, pe când o hipometilare, dimpotrivă, la activarea lor. Rezolvarea acestui paradox al metilării poate fi realizată doar luându-se în considerare multiplele fațete, amintite deja, ale reacției enzimatice de metilare (controlul acesteia din punct de vedere al specificității de substrat și de reacție, al simetriei situsurilor de recunoaștere, al gradului de metilare în situsurile preferențiale și al gradului de repetiții în di- sau trinucleotide etc.), cât și ale interferenței proceselor adiționale de control al expresiei genice (factorii de modulare a structurilor cromatinice în forme active sau supresate, precum acetilarea/deacetilarea ADN, ribozilarea etc.).

Studiul epigeneticii metilării ADN este îngreunat de dificultatea elucidarii relației sale cauzale cu activitatea transcripționala și modularea conformației cromatinice. Ultima decadă a fost efectiv consacrată dezbaterii acestei teme, în cadrul căreia au fost aduse atât date referitoare la metilarea ADN, ca eveniment inițiator al silențierii genelor, cât și date demonstrative ale rolului său de consolidare a stării represate de gene (indusă prin alte mecanisme).

O părere în general acceptată în prezent este cea referitoare la funcția supresoare a metilării ADN în secvențele **promotoare** de gene (Cedar, 1988; Hsieh, 1994). Asocierea cu activitatea transcripțională a inclus, în numeroase articole, interferența procesului metilării cu modularea conformației cromatinice, prin intervenția histonei H1. Dovezile experimentale nu au condus, însă, la concluzia privind afinitatea crescută a situsurilor metilate pentru histona H1(Campoy și colab., 1995), ci faptul că legarea histonei H1 ar induce creșterea nivelului local de metilare (Santoro și colab., 1995).

Dovezi multiple, descrise recent, aduc, pe de altă parte, argumente privind activarea unor gene de către metilarea, de data aceasta, a situsurilor CpG, aflate în cadrul **secvenței codificatoare** (Jones,1999).

Rezolvarea paradoxului amintit a fost realizată pe baza unui numitor comun stabilit la nivelul localizării insulelor CpG față de **situsul de inițiere a transcrierii:** poziția în **amonte** față de acesta ar determina, prin metilare, supresia promotorului, respectiv, *silențierea genică*; dimpotrivă, poziția în **aval**, de obicei, în cadrul secvenței codificatoare, nu ar împiedica elongarea transcriptului, deja inițiat, ci, dimpotrivă, o *rată crescută transcripțională* . Astfel de situații s-au descris pentru genele umane.

Ca o concluzie generală a rolului epigenetic pe care îl deține metilarea ADN în oncogeneză, se consideră actualmente că acesta s-ar exercita, în **genele supresoare de tumori**, prin *silențiere*, respectiv, hipermetilare, iar în **protooncogene**, prin hipometilare și, deci, *activare.*

11. HIPOMETILAREA PROTOONCOGENELOR

În ultima decadă s-au raportat într-o varietate de țesuturi maligne niveluri globale reduse de metilare a ADN. Gama Sosa și colaboratorii (1983) au observat faptul că, într-o gamă largă de tumori, hipometilarea nu numai că a fost corelată cu transformarea, ci și cu progresia tumorală (Bartolomei și Tilghman, 1997). În analizele lor, s-a constatat faptul că doar 7% din cele 43 de țesuturi normale au prezentat un conținut de 5mC sub 0,8%, acest procent crescând semnificativ la tumori : 10% din 21 de tumori benigne, 27% din 62 țesuturi maligne primare și 60% din 20 țesuturi maligne secundare. Pe de altă parte, Feinberg și colaboratorii nu au găsit o reducere în nivelurile de metilare a ADN-ului, în perioada de progresie de la neoplasia benignă de colon la cea malignă, ceea ce a sugerat faptul că hipometilarea ADN afectează într-o perioadă mai timpurie cancerul colorectal (Laird și Jaenisch, 1996).

Hipometilarea protooncogenelor a fost observată, în particular, în tumorile de ficat și în leucemii. Astfel, o varietate de protooncogene, cum ar fi gena *c-fos*, gena *c-myc*, ca și genele *Ha-ras* și *Ki-ras*, au prezentat niveluri reduse de metilare a ADN, în tumorile de ficat, la rozătoare (organisme model). Corelația cea mai puternică s-a observat în carcinoamele hepatocelulare umane, într-un situs specific, conținând dinucleotidul CpG, din cadrul exonului al treilea al genei *c-myc* (Laird, 1998). Aceast dinucleotid a fost găsit a fi hipometilat și în alte două cazuri de leucemie cronică mielomonocitică și cu un grad mare de hipometilare în cancerul uman colorectal. Pe de altă parte, în cadrul acestui situs s-a detectat o hipermetilare pronunțată în trei cazuri de leucemie acută mielogenică (Laird și Jaenisch, 1996). Alte exemple de hipometilare a protooncogenelor în diferite leucemii umane includ gena *Erb-A1* și gena *bcl-2* (Laird și Jaenisch, 1996).

12. HIPERMETILAREA GENELOR SUPRESOARE DE TUMORI

Creșterea regională a nivelurilor de metilare în ADN este bine documentată. Astfel, Baylin și colaboratorii (1991) au găsit , într-o varietate de tumori umane, *„pete fierbinți“* țintă de hipermetilare în cromozomii 3p, 11p și 17p. Acestea includ regiuni de *insule CpG*, care, în mod normal, nu sunt niciodată metilate „in vivo“, dar s-au găsit metilate în țesuturile tumorale. Acest fapt este o reminiscență a modificărilor care au loc în insulele CpG, în cadrul genelor neesențiale, în cultură de țesuturi („in vitro“).

Primele dovezi privind potențialul epigenetic al metilării ADN în inactivarea genelor supresoare de tumori au fost obținute prin cercetarea implicării genei *Rb* în cazurile sporadice de retinoblastom uman (Laird și Jaenisch, 1996). Astfel de raportări au indicat o frecvența de 3:21 și, respectiv, 5:32 cazuri, în care s-au găsit insule CpG hipermetilate, localizate în poziția 5' a genei *Rb*. Dovada implicării proceselor epigenetice s-a bazat pe faptul că, în cadrul genei *Rb*, nu s-a detectat nici o mutație.

Experimentele de transfecție transientă au arătat faptul că o hipermetilare în regiunea promotoare a *Rb* ar putea reduce expresia până la 8%, comparativ cu un control nemetilat.

Astfel, este posibil ca hipermetilarea genelor supresoare de tumori, capabilă să conducă la inactivarea genică, să determine un avantaj de creștere selectiv pentru celulele transformate.

Un alt caz de hipermetilare într-o gena supresoare de tumori a fost descris în cazuri de carcinom renal, respectiv, în gena von Hippel-Lindau (*VHL*) (Laird și Jaenisch, 1996). Frecvența hipermetilării a fost, în astfel de cazuri, de 5:26. Într-unul dintre cazuri, s-a constatat chiar metilarea ambelor gene *VHL* . De asemenea, cu o frecvență de 1:5 cazuri, s-a detectat o mutație supresoare, adițională la hipermetilarea amintită.

Un caz interesant de metilare progresivă în insulele CpG a fost descris pentru promotorul *Pa* al locusului *bcr-abl*, în leucemia umană mielogenă cronică (LMC): ADN extras în momentul diagnosticării a prezentat insulele CpG nemetilate, spre deosebire de cel extras în faza avansată a MLC, care a prezentat, în mod invariabil, metilarea acestor situsuri (Laird și Jaenisch, 1996).

O alterare genetică observată în liniile celulare tumorale și, într-un grad mai mic, în tumorile primare, este pierderea heterozigozității la cromozomul 9p21, care conține genele $p16^{INK4A}$ / *CDKN2* / *MTS1* și $p15^{INK4B}$. Au fost descrise mecanisme de inactivare a genei *p16*, printr-un mecanism de hipermetilare în CpG (Laird și Jaenisch, 1996). Tratamentul liniilor celulare cu agentul hipometilant 5-azaC a condus, în schimb, la reactivarea expresiei genei *p16*. Gena *p15* , cu un comportament asemănător, a fost detectată în glioame și leucemii.

În toate cazurile prezentate, a reieșit în mod clar faptul că secvența primară a ADN nu a fost afectată, însă, nu a fost posibilă precizarea rolului metilării ADN de inițiere sau de consolidare a stării transcripționale represate. Din punct de vedere practic, aceste observații au deschis calea tratamentului antitumoral cu agenții hipometilanți, în scopul restabilirii activității genelor supresoare de tumori. O astfel de abordare practică a avut succes în cazurile dezvoltării polipilor intestinali: s-a considerat că efectul protector al nivelului redus de metilare în șoarecii predispuși la o astfel de boală s-ar datora reducerii activitații de inactivare în genele supresoare de tumori (Laird și Jaenisch, 1996).

13. ROLUL GENETIC AL METILARII ADN ÎN CANCER

Modificarea genetică prevalentă în cancer este mutația de tranziție C-T. Sunt numeroase datele referitoare la frecvența acestei mutații punctiforme de referință, caracteristică diferitelor tipuri de cancer. Părerea unanim acceptată în prezent evidențiază rolul mutagen al însăși **ADN MTazei**, concomitent cu **rata mutațională crescută** în ținta preferată a enzimei, respectiv secvențele palindromice **5'-CpG-3'**. S-a constatat că resturile de citozină incluse în secvențele care nu fac parte din ținta atacului enzimatic nu prezintă o rată mutațională comparabilă (Laird și Jaenisch, 1996).

Citozin (5-metil-)-transferaza a fost descrisă drept o enzima complexă, capabilă să acționeze fie ca o **transferază**, și astfel să introducă modificări *epigenetice*, în cadrul conformatiei cromatinice și, deci, în starea transcripționala a unei gene, fie ca o **deaminază**, provocând modificări *genetice*, respectiv tranziții 5mC-T sau C-U.

Schemele din figura 3 redau sugestiv reacțiile și condițiile de reacție care conduc către fiecare produs posibil al acțiunii ADN MTazei. S-a evidențiat faptul că rata mare de tranziții 5mC -T reprezintă o consecință a deaminării citozinei în poziția C4. Printr-o deaminare similară, citozina nemetilată este și ea capabilă să producă , însă, uracil, tranziție care poate să conducă, de asemenea, la timină, după două runde de replicare a ADN. Cu toate acestea, rata tranziției, în cazul C este jumătate din cea observată la mC (Laird și Jaenisch, 1996). Astfel de constatări s-au bazat pe experimente efectuate „in vitro". Ele nu explică, însă, raportul incomparabil observat „in vivo", respectiv, al unei rate mutaționale de cca 40 ori mai înaltă în situsurile mC (Laird și Jaenisch, 1996). Această diferență este atribuită intervenției unui sistem reparator la mamifere, care detectează mai eficient uracilul, comparativ cu timina în perechile greșite U.G și, respectiv, T.G. Dacă se ia în considerare și faptul că, „in vitro", comparativ cu condițiile „in vivo", atât mC, cât și C sunt supuse unei deaminări cu o rată mai mare de trei ordini de mărime (Laird și Jaenisch, 1996), apare evidentă importanța rolului pe care îl joacă procesul reparator al produșilor de reacție.

Repararea resturilor de uracil sau de timina formate prin deaminare este catalizată de enzimele uracil-ADN-glicozilaza și, respectiv, timin-ADN-glicozilaza (Nederman și colab., 1994). Ambele enzime s-au identificat la mamifere și sunt implicate în reacția de recunoaștere specifică a uracilului (în cazul primei glicozilaze) sau respectiv, de recunoaștere a ambelor baze, uracilul și timina, aflate într-o împerechere gresită cu guanozina. Mecanismul de reparare implică, în ambele cazuri, excizia endonucleolitică a produșilor de deaminare, urmată de înlocuirea acesteia cu baza corectă, citozina, prin împerecherea adecvată a acesteia cu guanozina de pe catena de ADN opusă. Acțiunea enzimatică este, de altfel, facilitată de poziția extrahelicală a produsului de deaminare, o reminiscență a intermediarului covalent, format în reacția catalizată de ADN (citozin-5-)-metiltransferaza (Laird și Jaenisch, 1996).

Primele mutații asociate cu oncogeneza s-au raportat în genele *H-ras* și *K-ras*, însă gena frecvent descrisă în tumorile umane este *p53*, gena supresoare de tumori (Garcea și colab., 1989). Domeniul mutațiilor în cadrul acesteia este foarte variat, iar numărul mutațiilor înregistrate în tipuri individuale de tumori este de ordinul miilor (Laird și Jaenisch, 1996). Majoritatea mutațiilor observate în *p53* au fost localizate în domeniul de legare al ADN, între codonii 120 și 290. Gena umana *p53* conține 21 perechi dinucleotidice CpG, localizate tocmai în cadrul domeniului ce codifică regiunea amintită mai sus, de lungime egală cu 513 pb. S-a calculat că dinucleotidele CpG reprezintă 8,2% din acest domeniu al genei *p53*. De asemenea, în cadrul unui singur dinucleotid CpG, s-a estimat un număr de 6 tranziții posibile de baze.

În toate genele umane normale studiate, fiecare din perechile dinucleotidice sunt în întregime metilate (Laird și Jaenisch, 1996). Mutațiile de tranziție detectate reprezintă 2 din cele 6 posibile, menționate anterior, ceea ce ar implica o pondere de cca 2,7% (o treime din procentul reprezentativ de 8,25 al perechilor CpG din *p53*) a mutațiilor punctiforme, în CpG. Site-ul internet, organizat din mai 1996 de către Monica Hollstein, respectiv, gopher: // gopher. EMBL -Heidelberg. DE: 70/ 40/ pub/ databases/p53 (Laird și Jaenisch, 1996), a înscris 5089 mutații în *p53*, culese din 582 de surse. Dintre aceste mutații un procent de 30% au reprezentat tranziții în dinucleotidele CpG. Dacă se omit tumorile pulmonare și de ficat, bazate pe o incidență mare a mutațiilor specific induse de carcinogeni, această pondere se ridică la 35%. De asemenea, din cele 44 mutații *„missense“*, găsite în linia germinală, în cadrul genei p53, la pacienții cu sindrom Li-Fraumeni sau cu boli înrudite, 59% au fost datorate tranzițiilor din cadrul dinucleotidelor CpG (Laird și Jaenisch, 1996).

Frecvența extrem de mare a mutațiilor de tranziție în CpG, la gena p53, demonstrează clar faptul că acestea au loc la un nivel extrem de ridicat și că 5-

metilcitozina reprezintă un mutagen endogen extrem de puternic, atât în cadrul celulelor somatice, cât și în cele germinale.

Un alt factor important al oncogenezei, asociat cu efectul metilării ADN în dinucleotidele CpG este nivelul donorului de grupe metil, SAM. Acesta se transformă în S-adenozilhomocisteina (SAH), prin cedarea grupei metil acceptorului. Ulterior, SAH se scindează în homocisteină și adenozină. Metionina este regenerată din homocisteină, printr-o reacție dependentă de folat și cobalamină, care convertește metionina în SAM. Mecanismul alterat al biosintezei metioninei a fost recunoscut, cu două decade în urmă, a fi caracteristic celulelor maligne (Laird și Jaenisch, 1996). În condițiile culturii „in vitro“, celulele **transformate** se disting de cele **normale** prin *dependența fața de metionină*: primele nu pot crește fără **metionină,** în schimb, celelalte au capacitatea de a utiliza **homocisteina** ca precursor direct al metioninei. Aceasta dependența este presupusă a fi consecința, mai degrabă, a unei transmetiări și nu a unei biosinteze reduse de metionina (Laird și Jaenisch, 1996). Efectul net este, în realitate, accesul redus al metioninei în cadrul celulelor transformate (Laird și Jaenisch, 1996). Astfel, s-a observat în fazele timpurii ale carcinogenezei în ficat, la rozătoare, faptul că raportul SAM/SAH poate fi reechilibrat printr-un tratament cu SAM.

Condițiile de deficiență dietară în grupe metil au condus la carcinogeneză în ficat, după cum au indicat experimentele efectuate pe rozătoare, fără vreo interferență cu tratamente adiționale cu carcinogeni. În mod similar, s-a observat la șobolani tratati cu dimetilhidrazină, că o dietă deficitară în grupe metil determină incidența crescută în neoplazii colonale (Laird și Jaenisch, 1996).Giovannuci și colaboratorii (1993) au demonstrat o relație inversă între folatul dietar și incidența adenoamelor colorectale la oameni. Toate aceste rezultate nu au fost, însă, direct explicate prin medierea efectului menționat al dietei în folat de către deaminarea enzimatica a citozinei. Ele sugerează un model conform căruia, deficiența în grupe metil ar conduce la hipometilarea ADN, care, la rândul său, mediază oncogenicitatea prin mecanismele epigenetice descrise anterior..

Modelele descrise anterior, de implicare a ADN MTazei în deaminarea citozinei necesită încă dovezi convingătoare. Cu toate acestea, rolul menționat al enzimei rămâne o ipoteză deosebit de atractivă, deoarece ea unește într-un singur model efectele separate ale (i) metabolismului alterat al metioninei, în cancer, (ii) dietei deficitare în grupe metil, (iii) hipometilarea globală observată, în general, în celulele canceroase, în ciuda nivelului foarte ridicat al expresiei ADN MTazei și (iv) incidența mare a mutațiilor în dinucleotidele CpG, detectată în celulele tumorale.

Noile achiziții în dovezi experimentale se referă la cercetările efectuate pe gena de la șoarece pentru subunitatea reglatoare a proteinkinazei dependentă de AMPc: s-a observat deaminarea enzimatică ca sursă a mutațiilor simultane, detectate în metilcitozina reprezintă un mutagen endogen extrem de puternic, atât în cadrul celulelor somatice, cât și în cele germinale.

Un alt factor important al oncogenezei, asociat cu efectul metilării ADN în dinucleotidele CpG este nivelul donorului de grupe metil, SAM. Acesta se transformă în S-adenozilhomocisteina (SAH), prin cedarea grupei metil acceptorului. Ulterior, SAH se scindează în homocisteină și adenozină. Metionina este regenerată din homocisteină, printr-o reacție dependentă de folat și cobalamină, care convertește metionina în SAM. Mecanismul alterat al biosintezei metioninei a fost recunoscut, cu două decade în urmă, a fi caracteristic celulelor maligne (Laird și Jaenisch, 1996). În condițiile culturii „in vitro“, celulele **transformate** se disting de cele **normale** prin *dependența fața de metionină*: primele nu pot crește fără **metionină,** în schimb, celelalte au capacitatea de a utiliza **homocisteina** ca precursor direct al metioninei. Aceasta dependența este presupusă a fi consecința, mai degrabă, a unei transmetiări și nu a unei biosinteze reduse de metionina (Laird și Jaenisch, 1996). Efectul net este, în realitate, accesul redus al metioninei în cadrul celulelor transformate (Laird și Jaenisch, 1996). Astfel, s-a observat în fazele timpurii ale carcinogenezei în ficat, la rozătoare, faptul că raportul SAM/SAH poate fi reechilibrat printr-un tratament cu SAM.

Condițiile de deficiență dietară în grupe metil au condus la carcinogeneză în ficat, după cum au indicat experimentele efectuate pe rozătoare, fără vreo interferență cu tratamente adiționale cu carcinogeni. În mod similar, s-a observat la șobolani tratati cu dimetilhidrazină, că o dietă deficitară în grupe metil determină incidența crescută în neoplazii colonale (Laird și Jaenisch, 1996).Giovannuci și colaboratorii (1993) au demonstrat o relație inversă între folatul dietar și incidența adenoamelor colorectale la oameni. Toate aceste rezultate nu au fost, însă, direct explicate prin medierea efectului menționat al dietei în folat de către deaminarea enzimatica a citozinei. Ele sugerează un model conform căruia, deficiența în grupe metil ar conduce la hipometilarea ADN, care, la rândul său, mediază oncogenicitatea prin mecanismele epigenetice descrise anterior..

Modelele descrise anterior, de implicare a ADN MTazei în deaminarea citozinei necesită încă dovezi convingătoare. Cu toate acestea, rolul menționat al enzimei rămâne o ipoteză deosebit de atractivă, deoarece ea unește într-un singur model efectele separate ale (i) metabolismului alterat al metioninei, în cancer, (ii) dietei deficitare în grupe metil, (iii) hipometilarea globală observată, în general, în celulele canceroase, în ciuda nivelului foarte ridicat al expresiei ADN MTazei și (iv) incidența mare a mutațiilor în dinucleotidele CpG, detectată în celulele tumorale.

Noile achiziții în dovezi experimentale se referă la cercetările efectuate pe gena de la șoarece pentru subunitatea reglatoare a proteinkinazei dependentă de AMPc: s-a observat deaminarea enzimatică ca sursă a mutațiilor simultane, detectate în dinucleotidelele CpG din vecinătatea genei (Laird și Jaenisch, 1996). De asemenea, s-a constatat că tranzițiile C-T mediate de enzimă nu ar necesita condiții deficitare în grupe metil (Yebra și Bhagwat, 1995): o enzimă procariotă a fost capabilă să deamineze direct 5mC la T (Fig.3), printr-o reacție independentă de concentrația SAM. S-a sugerat ideea că această enzimă ar fi foarte eficientă în mutageneză și că ar fi putut trece neobservată în studiile din domeniu, deoarece există încă dificultăți în privința discriminării activităților de deaminare catalizate enzimatic și, respectiv, spontane, în condițiile naturale („*in vivo*“).

Dependența activității enzimatice de gradul de metilare a substratului este evidentă și din structura proteinei MTaza (Leonhardt și colab.1992). Informațiile privind secvența în aminoacizi atestă existența unei regiuni (fig. 6) bogate în cisteina, cu un situs de legare a Zn, capabilă să discrimineze situsurile CpG metilate de cele nemetilate (Bestor, 1992).

Dacă o activitate de întreținere poate fi activată de grupele metil, ce joaca un rol posibil de semnal, în cazul celei „de novo“, s-a pus pe drept cuvânt problema inițierii activității enzimatice de către alți factori, probabil legați de stringența activării sau supresiei unei anumite gene. Deși există numeroase date experimentale care diferențiază aceste două activități, nu sunt încă bine definiți factorii care determină alegerea „de novo“ a situsurilor metilabile. Domeniul transformarii genetice la plante, ca și cel al imprintingului la mamifere oferă, în prezent, un cadru de dezbateri intense în acest sens.

S-au propus diverse modele mai mult sau mai puțin plauzibile sau verificate practic, care să explice mecanismele moleculare ale **stabilirii profilului de metilare „de novo“ și „de întreținere“**. Unul dintre acestea se referă la influența regiunii genomice de inserare a alogenelor (termenul de alogena putând fi extins, în accepțiunea actuală, și la fragmentele de ADN care se inserează într-o regiune nouă a genomului prin procesele cunoscute de recombinare) (Szyf, 1991; Meyer, 1993).

În ceea ce privește diferențierea activității enzimatice pe baza gradului de metilare a substratului, actualmente, există câteva indicații privind faptul că cele două activități menționate pot fi atribuite unei enzime unice (Christman și colab, 1995). Astfel, s-a dovedit că semnalele inerente din structură a ADN pot acționa „in vivo“ pentru a iniția sau bloca metilarea „de novo“ a regiunilor adiacente din ADN.

Pentru identificarea secvențelor capabile de a iniția metilarea „de novo“ a ADN „in vitro“, a fost studiată o serie de oligodeoxinucleotide cu rol de substrat, conținând restul de citozina în contexte de secvențe diferite. S-a observat că activitatea unei MTaze de menținere, poate avea o activitate de metilare „de novo“ în anumite secvențe oligonucleotidice, care ar fi stimulată de anumite resturi de 5mC adiacente secvenței metilate enzimatic. În aceste cazuri, s-a constatat că eficiența metilării „de novo“ ar fi similară cu cea a metilării de întreținere, stimulată de resturile de 5mC dintr-o dublă catenă de ADN (hemimetilată) (Vanyushin, 1984).

Acest rezultat a sugerat faptul că ADN dublu-catenar nu este, în mod necesar, substratul primar pentru activitatea de metilare „de novo“; mai degrabă, se consideră că anumite structuri monocatenare, din cadrul buclelor ADN, formate în cursul normal al proceselor de replicare sau reparare a ADN, ar putea servi drept situsuri de „nucleație“ pentru metilarea „de novo“ a regiunilor adiacente unor astfel de structuri (Kass, 1997).

La o concluzie similara se referă și autorii Matzke și Matzke (1995), sugerând un mecanism prin care este activată metilarea unor copii unice de transgene în cadrul unui genom vegetal gazdă. Aceștia considerau integrarea transgenelor un proces de perturbare a domeniilor funcționale genice, respectiv, apariția unui gradient de izocori (corelat cu conținutul în CG al domeniilor respective). Acest gradient poate fi soluționat prin metilarea perechilor CG perturbatoare și, deci, silențierea transgenelor respective, de către genomul gazdă, în cadrul așa-numitei reacții de apărare. Astfel de mecanisme au explicat, de altfel, numeroasele fenomene de variație a expresiei transgenelor vegetale în câmp și, mai mult, au stat la baza soluționarii practice a acestei probleme: atașarea, în cadrul constructului vectorial utilizat în tehnica transferului de gene la plante, a unor regiuni de atașare la proteinele (matrix-ul) eșafodale (SAR-uri sau MAR-uri), la capetele genei de interes, a condus la inserarea acesteia din urmă, în cadrul genomului gazdă, ca domenii funcționale independente, fără să perturbe alte domenii funcționale, autohtone. Soluția a fost utilizată cu succes în optimizarea a numeroase tehnici de transgeneză la diferite plante de interes economic (Finnegan și Mc Elroy, 1994).

Un alt model bazat pe formarea suprastructurilor în forma de „ac de păr“ (*hairpin*), în cadrul catenelor de ADN noi, formate prin replicare, în condițiile unui proces de *slippage*, sugerează preferința MTazei de legare, stabilizare și metilare sau mutagenizare a unor astfel de situsuri (Clark și colab., 1995).

CAPITOLUL XXVI

IMPRINTING GENIC — IMPRINTING GENOMIC: MECANISME ȘI IMPLICAȚII ÎN PATOLOGIA UMANĂ

1. INTRODUCERE

Prin imprinting sau amprentare genetică (genică și genomică) se înțelege o modificare epigenetică a elementelor genetice, dependentă de originea gametică a acestora (Crouse, 1960; Monk, 1988). Modificarea epigenetică, spre deosebire de modificarea genetică (mutația), nu afectează structura genei. Aceasta reprezintă mai curând un proces de reglare a activității genice, pe termen mediu sau lung, prin care gena sau genomul imprintat (amprentat) este scos din funcție. Când o alelă aflată într-un locus amprentabil traversează procesul de gametogeneză la un anumit sex, capacitatea sa de a fi exprimată este neafectată. Când însă aceeași alelă traversează procesul de gametogeneză de la sexul opus, ea devine inactivată, adică incapabilă de a fi exprimată. O asemenea alelă este denumită alelă „amprentată". Gena sau genele care controlează un asemenea proces de inactivare se numesc *„imprinting" genes, gene imprintoare ("imprintor")* (Forejt și Gregorova, 1992).

Fenomenul de amprentare genetică a fost evidențiat la o gamă largă de organisme, plante și animale, dovedind conservatorismul său evolutiv (Birchler și Hart, 1 987; Brown și Nelson-Rees, 1961; Chandra și Brown, 1 975; Flavell și O'Dell, 1990; Heslop-Harrison, 1990; Hessler, 1961, Kermicle și Alleman, 1990; Spofford, 1976; Werren, 1991; Werren și colab., 1987).

Fenomenul de imprinting a fost pentru prima dată evidențiat la **Sciara coprophila**, de către H. Crouse, în anul 1960, care l-a confirmat în 1966 și, împreună cu Brown (1971), l-a explicat, ca mecanism. La această insectă, zigotul conține două seturi de autozomi și trei cromozomi de sex, dintre care doi sunt de origine paternă: $A^mA^pX^mX^pX^p$ (A= autozom; X= heterozom); m = matern, p = patern. În cursul embriogenezei, un cromozom X de proveniență masculă este pierdut din linia germinală, de la ambele sexe, și din celulele somatice ale femelei

$(A^mA^pX^mX^p)$. Tot astfel, setul patern de cromozomi este eliminat în cursul spermatogenezei, la prima diviziune meiotică (A^mX^m). Acest mecanism de eliminare a cromozomului X de proveniență paternă, respectiv a unui set întreg de cromozomi, și anume a setului de cromozomi de origine paternă, are în sine un caracter neobișnuit, ciudat: este ca și când acești cromozomi de origine paternă ar fi într-un anume fel marcați sau amprentați, înainte de fuziunea gameților de sex opus. Amprentarea, adică *imprinting*-ul cromozomilor, se face în cursul spermatogenezei. Este ca și când în timpul desfășurării etapelor spermatogenezei, cromozomii sunt „marcați“, astfel că ei vor putea fi oricând recunoscuți de către sistemele moleculare-celulare că au aparținut organismului mascul.

La insecte coccide, un asemenea *imprinting* al cromozomilor de origine paternă conduce nu la eliminarea, ci la heterocromatinizarea acestora, ceea ce înseamnă în fond tot o eliminare, dar aceasta este una fiziologică, întrucât cromozomii heterocromatinizați sunt inactivi în transcrierea genică. Și la marsupiale s-a remarcat heterocromatinizarea cromozomului X, de origine paternă. Același proces se remarcă în trofectodermul și endodermul primitiv la murine, precum și în citotrofoblastele umane (Lyon și Rastan, 1 984).

Tehnica de transplant de pronuclei, aplicată la șoarece, a permis, după identificarea pronucleului matern (m) și a pronucleului patern (p), să fie îndepărtat unul sau celălalt și reintroduși în zigoți enucleați. Se construiesc astfel embrioni biparentali diploizi ginogenetici (2m:Op) și androgenetici (Om:2p) care vor fi implantați în oviductele unei femele pseudopregnante. S-a constatat că asemenea embrioni nu supraviețuiesc, fiind eliminați fie în etapa de preimplantare, fie în etapa timpurie de postimplantare. Ginogenotul s-a dezvoltat aproape exclusiv embrionic, pe când androgenotul a dezvoltat aproape exclusiv structurile extraembrionice. Asemenea rezultate (McGrath și Solter, 1984; Surani și colab., 1984) sugerează existența unei contribuții parentale neechivalente la nucleul zigotului și că imprintingul a fost restrâns la pronucleu, mai curând decât la o componentă citoplasmatică. De aici, s-a tras concluzia că GENELE SPECIFICE POT FI MOȘTENITE ÎN FORMĂ FUNCȚIONALĂ DE LA UN PĂRINTE ȘI ÎN FORMĂ NEFUNCȚIONALĂ DE LA CELĂLALT PĂRINTE. În consecință, androgenoții și ginogenoții exprimă fiecare un subset de produși genici normali care, atunci când se combină în zigot, realizează constelația de gene, și implicit de produși genici, care asigură dezvoltarea normală a embrionului. Asemenea experiențe mai demonstrează că expresia genică în cursul dezvoltării normale a embrionului implică interacțiunea dintre genomul matern și genomul patern, cu exprimarea produșilor genici, unii de origine maternă, alții de origine paternă. La ginogenot, ca și la androgenot, este exprimat doar un singur subset de produși genici și ca urmare, nu are loc o interacțiune genică cerută de o dezvoltare normală a embrionului; în consecință, aceasta nu are loc.

În cadrul experiențelor de transfer de pronuclei au fost utilizate translocații robertsoniene (fuziuni centomerice) și translocații reciproce în realizarea de embrioni cu disomie uniparentală pentru un anumit cromozom, datorită nondisjuncției meiotice (Cattanach și Kirk, 1985). Studiul dezvoltării la asemenea șoareci a permis să se construiască o hartă de „noncomplementație“, din care s-a dedus că pentru unii cromozomi sau unele segmente cromozomale este necesară contribuția ambilor părinți pentru a se asigura viabilitatea normală a embrionului și a organismului. Interesant este faptul că unele regiuni cromozomale cu duplicații materne și deficiențe paterne (ex. 2p, 6p și 7p) au efect letal, iar alte regiuni cu duplicații paterne și deficiențe materne au același efect letal (ex. porțiuni ale cromozomilor 17p și 17q).

Explicația este că o genă sau mai multe gene localizate în aceste regiuni este/sunt active numai atunci când sunt moștenite de la un anumit părinte, unele de la mamă, altele de la tată.

Necesitatea contribuției biparentale pentru dezvoltarea normală este evidentă la animalele la care apare fenomenul disomiei uniparentale (UPD), adică care moștenesc ambele copii ale cromozomilor sau segmentelor cromozomale dintr-o pereche dată, de la un singur părinte.

Letalitatea sau realizarea unui fenotip anormal apare atunci când ambele copii ale genei/genelor din asemenea regiuni sunt moștenite de la părintele de la care gena se transmite imprintată, spre a fi nefuncțională.

La șoarece, regiunea distală a cromozomului 2 și regiunea proximală a cromozomului 11 sunt legate de apariția unor fenotipuri anormale opuse, depinzând de ereditatea parentală. Astfel, în cazul cromozomului 2, cu disomie maternă și nulisomie paternă, apare fenotipul hipokinetic, cu părți laterale flate și spate arcuit, pe când constituția genetică cu disomie paternă și nulisomie maternă condiționează un fenotip caracterizat prin hiperkinezie, cu corp pătrat și spate flat (Cattanach și Kirk, 1985).

Unele regiuni cromozomale precum 2q, 7q și 11p condiționează letalitatea, atunci când sunt disomice uniparentale pentru ambii părinți, posibil datorită imprinting-ului pe două gene din această regiune, una imprintată matern, alta imprintată patern (Beechey și Searle, 1987; Cattanach și Kirk, 1985).

Există și cromozomi care nu prezintă efecte ale disomiei uniparentale și nu conțin loci genici imprintabili.

Utilizarea șoarecilor transgenici a permis să se stabilească existența a mult mai multor regiuni genomice susceptibile la imprinting, decât pot fi ele evidențiate prin analiza fenomenului de complementație genică și realizarea hărților de non complementație. Prin transgeneză pot fi introduși loci genici noi în genomul de șoarece, prin microinjecție de ADN, și aceștia pot fi menținuți în stare hemizigotă cu transmitere la 50% din descendenți. IMPRINTING-ul ESTE, SE PARE, UN PROCES DE INACTIVARE FUNCȚIONALĂ. Cercetările actuale dovedesc că regiunile inactive ale cromatinei sunt hipermetilate la nivelul unor „insule“ CpG, adică în zone din ADN, la nivelul cărora se află o mulțime de perechi CG, dintre care unele sunt metilate. În numeroase laboratoare au fost analizați loci transgenici de origine maternă sau de origine paternă, cu atenție deosebită acordată gradului de metilare a acestora. Sapienza și colaboratorii (1987) au studiat fenotipul de metilare al locilor transgenici în linii hemizigote pentru gena *troponinei I* (TNI), funcțională în fibrele musculare. Ei au constatat că această genă devine hipermetilată, atunci când este moștenită pe linie maternă și hipometilată, atunci când este moștenită pe linie paternă. Acest model de imprinting genic se întâlnește la multe sisteme biologice (Hadchouel și colab., 1987; Reik și colab., 1987; Swain și colab., 1987), dar expresia transgenei a fost direct corelată cu starea de metilare într-un singur caz (Swain și colab., 1987). Aproximativ 20-25% din totalitatea locilor studiați exprimă un efect similar în fenotipul metilării ADN, dependent de originea gametică a lor. Dintre transgenele amprentate care au fost cartate genetic, nouă sunt localizate în zone susceptibile la imprinting, fapt definit prin cartarea de noncomplementare, ceea ce sugerează că unele efecte ale imprintingului sunt subtile.

IMPRINTING GENIC/GENOMIC REPREZINTĂ O MODIFICARE A MATERIALULUI GENETIC CARE NU ALTEREAZĂ INFORMAȚIA EREDITARĂ, DEOARECE O ASEMENEA MODIFICARE ESTE REVERSIBILĂ, DE LA O GENERAȚIE LA ALTA. ACEASTA ESTE DOVADA CARACTERULUI EPIGENETIC AL UNEI ASEMENEA MODIFICĂRI CARE ESTE DEPENDENTĂ DE SEXUL PĂRINTELUI DE LA CARE A PROVENIT ACEL MATERIAL GENETIC (CROMOZOMUL SAU GENA), FIIND DEPENDENT ÎN CONSECINȚĂ, DE ORIGINEA MATERNĂ SAU PATERNĂ A GAMETULUI CARE A APORTAT-O ÎN ZIGOT.

Un model supersimplificat al fenomenului de IMPRINTING poate fi redat astfel:

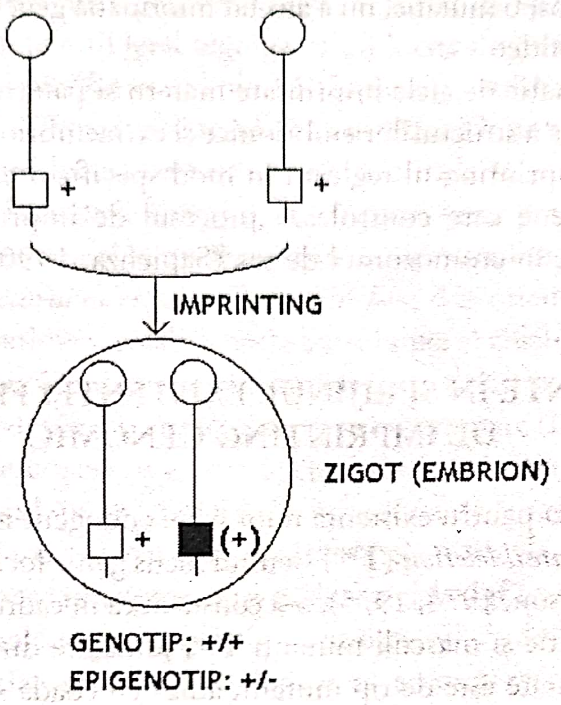


Fig. 1 — Modelul de inactivare alelică pentru imprinting genomic. Pătratele reprezintă alelele de la un locus modificabil. Activitatea genică supusă imprinting-ului cu specificitate de origine gametică determină inactivarea unei alele (pătratul negru) aflată într-un locus modificabil. (după Peterson și Sapienza, 1993).

În acest model, se manifestă fenotipic alela adusă de gametul femel în zigot, deoarece alela genitorului patern, chiar dacă este tot dominantă, trecând însă prin spermatogeneza acestuia, a fost amprentată să nu fie funcțională în descendență.

Modificarea dependentă de originea gametului este esența fenomenului de amprentare genică/genomică (imprinting). Amprentarea a fost eficientă doar la alela care a traversat spermatogeneza.

Fie în cursul gametogenezei, fie înainte de fuziunea pronucleilor, după fecundație, una din cele două alele, inițial echivalente funcțional, este marcată epigenetic, pe o cale oarecare, ceea ce o face să se diferențieze de omoloaga sa, la nivelul zigotului. Pe această cale, în locusul ocupat de cele două alele, una rămâne nemodificată, cealaltă este modificată epigenetic, adică amprentată, astfel că locusul ocupat de cele două alele, chiar dacă este homozigot din punct de vedere genetic, devine un locus hemizigot din punct de vedere epigenetic. Efectul este epigenetic, deoarece o alelă care este inactivă într-o generație poate deveni reactivată într-o generație ulterioară, ceea ce este o dovadă clară a faptului că evenimentul originar de inactivare nu a fost o mutație, nu a afectat informația genetică primară, respectiv secvența de nucleotide.

Această combinație de alele imprintate matern și patern este necesară pentru dezvoltarea normală a structurilor embrionice și extraembrionice, deși nu este încă clar faptul dacă imprinting-ul reglează în mod specific dezvoltarea. Cel puțin o genă sau câteva gene care controlează procesul de imprinting se prezice a fi localizată/localizate în cromozomul de sex (Sapienza, 1990).

2. ARGUMENTE ÎN SPRIJINUL EXISTENȚEI FENOMENULUI DE IMPRINTING GENOMIC

Dovada genetică pentru existența unor gene endogene amprentate este adusă de mutația „*hairpintaildeletion* (T^{hp})" a unui locus genic localizat pe cromozomul 17, la șoarece (Johnson, 1974, 1975). S-a constatat că în cadrul încrucișărilor dintre femele de tip sălbatic și masculi mutanți T^{hp}, jumătate din descendență este de tip sălbatic și jumătate este de tip mutant, adică cu coadă scurtă.

În cadrul încrucișărilor dintre femele mutante T^{hp} și masculi de tip sălbatic, toți descendenții viabili au fost de tip sălbatic, dar jumătate din descendență a murit în cursul vieții intrauterine. Johnson (1974, 1975) a explicat că o asemenea comportare a mutației s-a datorat diferențialului de timp de exprimare a alelelor maternă și paternă, la locusul T^{hp}.

Efectul matern, asociat cu locusul T (**Tme**), în regiunea deleției T^{hp} este determinator al letalității specific materne (Winking și Silver, 1984). Alela paternă pentru receptorul tip 2 al factorului de creștere asemănător insulinei desemnat **Igf2r**, localizat în locusul **Tme**, este neexprimată, ceea ce a determinat să se propună că **Igf2r** și **Tme** reprezintă unul și același lucru (Barlow și colab., 1991). Analiza segregării deleției T^{hp}, de tip matern, la masculii de **Mus musculus** care nu au suferit inactivarea locusului **Tme**, a permis să se tragă concluzia că expresia la nivelul acestui locus se află sub controlul unei singure gene nelincate, desemnată gena **Imprintor-1**, genă care are două alele, dintre care doar una inactivează locusul **Tme** (Forejit și Gregorova, 1992).

Interesantă pentru înțelegerea fenomenului de imprinting este și linia DDK de șoarece, care prezintă caracteristici genetice neobișnuite. Masculii liniei consangvine DDK se pot împerechea cu femelele ce aparțin altor linii consangvine, producând un număr normal de hibrizi F1, viabili. Dacă însă se încrucișează femele DDK cu masculi ce aparțin altor linii consagvine, până la 95% dintre embrioni mor, în cursul perioadei de preimplantare (Babinet și colab., 1990; Wakasugi, 1974). Chiar și atunci când genotipul hibrizilor reciproci din F1 este identic, schimbarea originii parentale a genomului este însoțită de apariția unui fenotip de letalitate polară. Caracterul letal segregă ca un locus singular, în cadrul experiențelor de retroîncrucișare (*backcross*) din F1 (Sapienza și colab., 1992, Wakasugi, 1974; Baldacci și colab., 1992) și se consideră că în această linie a avut loc o reversie a imprinting-ului acestui locus, ceea ce a condus la izolarea reproductivă.

Aceste exemple vorbesc de la sine despre existența unui proces de imprinting al genelor endogene, dovedit și la nivel biochimic, prin analiza genelor endogene care codifică pentru *factorul de creștere II, insulin-like,* desemnat **Igf2**, apoi pentru **Igf2r** și pentru H19 (Barlow și colab., 1991; Bartolomei șI colab., 1991; DeChiara și colab., 1991). Analiza feontipului determinat de o alelă tip **null** a genei **Igf2**, creat prin recombinare omoloagă, în celulele stem embrionare (DeChiara și colab., 1990) a permis să se descopere că ereditatea pe linie maternă a alelei nu produce nici un fenotip detectabil, pe când moștenirea acestuia de la tată a determinat un fenotip caracteristic cu șoareci mai mici decât formele normale. Acest fenotip este determinat de transcrierea, aproape exclusivă, doar a alelei **lgf2r**, de origine paternă. Localizarea cromozomală a genei lgf2, în cromozomul 7, de la șoarece, este în acord cu datele genetice care implică faptul că această regiune a genomului șoarecelui a suferit imprinting genomic. Surprinzător oarecum a apărut faptul că gena H19, strâns lincată cu lgf2, este amprentată în direcție opusă, adică numai alela care provine de la mamă a acestei gene este exprimată (Bartolomei și colab., 1991). Faptul că două gene aflate într-o vecinătate atât de mare (la maximum 200 kb separate una de cealaltă) pot prezenta modele opuse de imprinting reprezintă un argument pentru un pattern de imprinting de tip **„genă-cu-genă"**. O alternativă pentru acest pattern este aceea că imprinting-ul este un eveniment regional cu competiție între gene pentru un set comun de elemente transactivatoare (Zemel și colab., 1992). Dacă coexpresia lui **H19** si **lgf2** apare în cadrul aceleiași celule, numai o alelă de la fiecare locus va fi exprimată și ambii loci vor fi amprentați. Dacă ambele alele ale fiecărui locus sunt exprimate în aceeași celulă, nu va mai fi exprimat celălalt locus. Astfel, deși **H19** și **lgf2** prezintă același pattern tisular de expresie, **H19** nu este exprimată în plexul coroid sau leptomeninge. Acestea sunt singurele două țesuturi despre care se știe că exprimă ambele alele ale **Igf2** (DeChiara și colab., 1991). Gena **Igf2r** este și ea amprentată, cu expresia realizată numai pentru alela care provine de la mamă, în acest locus (Barlow și colab., 1991). Localizarea cromozomală a acestei gene (cromozomul 17 de șoarece) predispune la imprinting în această regiune a genomului, așa cum a reieșit din experiențele genetice (Cattanach și Beecheg, 1990).

3. IMPRINTING GENOMIC ÎN BOLILE EREDITARE UMANE

Faptul că disomia uniparentală (UPD) ar putea juca un anumit rol în bolile genetice umane a fost demonstrat, pentru prima dată, la o persoană cu fibroză chistică, având statura mică (Engel, 1980; Spence și colab., 1988). Pacientul moștenise două copii ale unuia și aceluiași cromozom 7, de origine maternă (isodisomie maternă). Copiile duplicate ale aceluiași cromozom 7, la proband, erau purtătoare ale alelei mutante care condiționează fibroza chistică. Boala era determinată de disomie uniparentală, datorită expresiei unei mutații recesive și nu datorită imprinting-ului parental. Cauza genetică a retardației în creștere a probandului a fost la început neclară. Ulterior, s-au identificat numeroase cazuri de retardație în creștere, asociate cu UPD matern al cromozomului 7, sugerându-se o asociere și cu sindromul Silver-Russel. Și disomia maternă a cromozomului 14 este corelată cu anomalii fenotipice. Nu au fost încă definite cu exactitate regiunile amprentate ale cromozomilor umani 7 și 14, astfel că nu s-au putut carta genele supuse acestui proces.

La om, sunt bine stabilite efectele de imprinting genomic pentru cromozomii 7, 11, 14 și 15 (Ledbet și Engel, 1995). Genele amprentate apar a fi grupate în clusteri și organizate ca domenii cromozomale care conțin gene ce au o expresie specifică părintelui care le-a transmis, prezentând și diferențe cu specifictate alelică în metilarea ADN, programarea în timp a replicării și organizarea cromozomală în domenii.

Diferențele în expresia genetică condiționate de originea parentală a alelelor au fost observate și în cazul sindroamelor de deleție cromozomală la om. Originea parentală a cromozomului care poartă o deleție sau o translocație determină sau modifică manifestările clinice la un număr de sindroame umane, printre care sindromul Prader-Willi (PWS) și sindromul Angelman(AS), cu simptomatologie clinică cu totul diferită.

Sindromul Prader-Willi se caracterizează prin hipotonie în perioada infatilă, obezitate înnăscută cu hiperfagie, hipogonadism, hipogonadotrofie, picioare și mâini mici, retardație fizică și mentală și un facies specific. Frecvența sa este de 1 la 25.000 de nașteri.

Sindromul Angelman se caracterizează prin hiperactivitate, anomalii ale EEG, retardație mentală severă, dispoziție de fericire, cu râs neobișnuit și frecvent, facies specific cu gură mare și obraji roșii, contracții epileptice neobișnuite și mișcări ataxice repetitive, simetrice.

În cazul disomiei uniparentale care conduce la apariția sindromului Angelman, ambii cromozomi ai perechii 15 sunt de origine paternă, pe când în cazul sindromului Prader-Willi ambii cromozomi ai perechii 15 sunt moșteniți de la mamă (Nicholls, 1991; Nicholls și colab., 1989). Butler și colaboratorii (1983–1986) au fost primii care au semnalat că imprinting-ul prenatal ar putea fi implicat în etiologia PWS. Această concluzie a venit de la constatarea că delețiile cromozomale erau exclusiv de origine paternă, fapt confirmat prin utilizarea probelor clonate de ADN, din regiunea 15q11-13. Deleția este de cel puțin 5000 Kb. Majoritatea cazurilor de PWS, care nu sunt cauzate de deleția cromozomului patern 15q11-13, sunt determinate de disomie uniparentală maternă (UPD). Aceste cercetări arată că PWS este consecința deleției unei regiuni 15q11-13 de origine paternă, imprinting-ul jucând un rol esențial în patogeneza acestui sindrom. Originea maternă a delețiilor din AS a fost demonstrată la nivel cromozomal de către Knoll și colaboratorii, în anul 1989, delețiile acestea apărând în cromozomul 15, de origine maternă. Rolul imprinting-ului în apariția AS a fost confirmat prin constatarea UPD patern ce implică cromozomul 15 în două cazuri de AS în care nu apar deleții. Contribuția UPD patern în sindromul Angelman este întâlnită în doar 5% dintre cazuri, covârșitoarea majoritate a acestora fiind caracterizate de deleții care apar exclusiv pe cromozomul 15 de origine maternă. Astfel, AS se deosebește de PWS, acesta din urmă fiind în cea mai mare parte a cazurilor cu nondeleții care derivă din UPD. Originea exclusiv maternă a delețiilor în AS și apariția UPD patern în această dereglare arată cu convingere rolul imprinting-ului în AS și sugerează că gena sau genele responsabile de AS sunt exprimate numai din cromozomul matern 15.

Analiza citogenetică la pacienții cu deleții cromozomale vizibile arată că 60–70% dintre cei cu sindrom Prader-Willi au deleții ale regiunii 15q 11-13 de origine paternă, pe când cei cu sindrom Angelman au deleția regiunii 15q 11-13, derivată de la mamă (Knoll și colab., 1991; Magenis și colab., 1990). Aceasta este un exemplu concludent că, depinzând de originea parentală a cromozomului 15, deleția unei regiuni specifice a acestuia și anume regiunea q11 -13 are consecințe diferite, ceea ce este o dovadă a faptului că această regiune este supusă IMPRINTING-ului. Analiza delețiilor la nivel submicroscopic, în această regiune, a arătat că situsul critic pentru cele două sindroame este distinct (Ozcelik și colab., 1992). Se presupune că în această regiune se află o genă sau un grup de gene care se exprimă în exclusivitate dacă sunt de proveniență maternă, ceea ce conduce la manifestarea simptomatologiei caracteristice sindromului Angelman, atunci când este deletată, dar, în aceeași regiune, există o a doua genă sau grup de gene care se exprimă exclusiv dacă sunt aportate de cromozomul patern, iar dacă asemenea alele de proveniență paternă sunt pierdute, este generat sindrornul Prader-Willi. Regiunea deletată în PWS codifică în mod normal un polipeptid asociat ribonucleoproteinei nucleare mici (SNRPN), abundente în creier, implicate în splicing-ul ARNm.

Această genă a fost prima cartată într-o regiune de 1000 Kb din cromozomul 7 de șoarece, într-o regiune care prezintă omologie cu o regiune corespunzătoare din cromozomul uman 15q 11-13 (Leff și colab., 1992; Ozcelik și colab., 1992). Această genă este amprentată matern, la șoarece. De aici, s-a sugerat că sindromul Prader-Willi poate fi cauzat, în parte, de defecte în procesarea ARNm. Gena **Snrpn**, amprentată patern, este strâns lincată cu gena **Gabrb**, fiind în consecință o genă candidat, implicată în geneza sindromului Prader-Willi.

Investigațiile efectuate de Saitoh și colaboratorii (1992) au evidențiat pierderea genei Gabrb pentru subunitatea b-3 a receptorului acidului gamma-aminobutiric ($GABA_A$), un neurotransmițător inhibitor, exprimat în creier, într-o familie cu trei copii afectați de sindromul Angelman. Bunica din partea mamei era normală, precum și mama acestor copii, dar purtau aceeași deleție, fără vreun efect fenotipic evident. Absența genei pentru Gabrb transmisă pe linie maternă este cauza apariției sindromului Angelman. Aceasta sugerează că atunci când copia genei Gabrb (și/sau alte gene) derivată pe linie maternă este absentă sau inactivă prin mutație, sunt asigurate condițiile pentru manifestarea simptomelor sindromului Angelman, pe când absența copiei (copiilor) de proveniență paternă nu are efect fenotipic detectabil, pentru simptomatologia acestui sindrom.

Snrpn nu a fost detectată la șoarecii care prezentau duplicații ale regiunii centrale a cromozomului 7 de origine maternă, aceasta, nu numai că este prezentă, dar este și amplificată, la șoarecii cu duplicații în cromozomul de origine paternă, ceea ce sugerează că ambele copii de origine paternă ale acestei gene sunt funcționale în transcrierea genică. Aceasta este dovada peremptorie a *imprinting-ului* matern al genei **Snrpn**.

Expresia genei **Gabrb** este detectată în creierul tuturor șoarecilor, indiferent de starea duplicației, ceea ce constituie o dovadă că această genă nu este **amprentată în creierul** șoarecilor, cel puțin pentru acest nivel de analiză.

Construirea unui YAC care cuprinde și o regiune mare a cromozomului uman incluzând 15q11-q13, ce este în mod obișnuit deletată în PWS și sindromul Angelman (AS), a permis identificarea și clonarea a numeroase gene noi din această regiune. Dintre acestea, genele **PAR-5** și **PAR-1** se cartează în cadrul a 250Kb distale din SNRPN. Ambele gene sunt exprimate în fibroblaste în cultură și în limfocitele persoanelor cu deleția 15q11-q13 a cromozomului matern în AS, dar nu și în celulele pacienților cu deleție în PWS, ceea ce sugerează că, asemănător SNRPN, PAR-1 și PAR-5 sunt exprimate numai din cromozomul patern. A patra genă exprimată patern s-a numit gena IPW și se cartează, de asemenea, distal față de SNRPN. Regiunea comună de deleție ce se suprapune cu aceste microdeleții PWS s-a numit ***regiunea de control a***

imprinting-ului (ICR), deoarece aceasta apare a regla expresia tuturor celor trei gene în domeniul transcripțional PWS.

Nu s-a putut stabili dacă PWS este consecința expresiei anormale a uneia sau a mai multor gene, în domeniul transcripțional PWS. Asocierea PAR-1 și IPW cu PWS este neclară, de vreme ce aceste gene nu apar a conține vreun cadru deschis citirii și implicarea potențială a lor în fenotipul PWS nu este evidentă. Pe de altă parte, două alte gene imprintate, **H19** și **Xist** sunt transcrise, dar nu sunt traduse în proteine și s-a presupus că aceste gene joacă un rol în imprinting-ul altor gene. PAR-1 și IPW ar putea să funcționeze, de asemenea, în reglarea imprinting-ului sau expresiei altor gene, incluzând SNRPN, ceea ce se poate asocia cu unul sau mai multe aspecte ale fenotipului PWS.

O importantă manifestare a imprinting-ului parental este metilarea ADN cu specificitate alelică și a fost detectată în numeroși loci din regiunea PWS/AS, incluzând D15S63 și SNRPN (Lalande, 1997). Metilarea preferențială a alelei materne este detectată în D15S9, D15S63 și capătul 5' al SNRPN. Acest patern de metilare în regiunea PWS este în acord cu expresia specifică a alelei paterne a genelor din cazurile de PWS. Intronul 5 al SNRPN are un situs care este metilat însă, după un patern diametral opus, cu alela paternă fiind metilată extensiv față de alela maternă inactivă. În cazurile de deleții și UPD ale PWS numai situsul matern metilat este detectat în D15S63 și capătul 5' al SNRPN. În cazurile de AS ce au la bază deleția sau UPD, rămân nemetilate situsurile D15S63 și 5'-SNRPN. Ca urmare, majoritatea cazurilor de PWS și AS pot fi detectate prin analiza metilării diferențiate, fiind deplin dovedită utilitatea testului de metilare a D15S63 în diagnosticarea clinică a PWS și AS.

Analiza cineticii bandării de replicare arată că cele mai multe dintre regiunile omoloage ale genomului uman se replică sincron, în cursul fazei S a ciclului celular. O asemenea analiză, la nivelul regiunii 15q11-q13, demonstrează sincronia de replicare a celor doi omologi, în aproximativ 40% dintre celule, la oamenii sănătoși. Analiza bandării de replicare a regiunii 15q11-q13 a demonstrat asincronia replicării celor doi omologi în 40% dintre celulele persoanelor normale. Analiza prin tehnică FISH a demonstrat, de asemenea, asincronia replicării în regiunea PWS/AS ca și a altor regiuni imprintate. Replicarea paternă precede pe cea maternă la nivelul celei mai mari părți a regiunii. Analiza cineticii bandării de replicare a confirmat o asemenea caracteristică.

Pattern-ul replicării cu specificitate alelică este însă diferit în regiunea intergenică dintre GABRB 3 și GABRA 5, cu replicarea mai timpurie pe cromozomul 15 de origine maternă.

Pattern-urile de replicare cu specificitate alelelică au fost cercetate în celulele pacienților cu PWS și AS. Programarea în timp a replicării ADN la loci din regiunea

PWS/AS este sincronizată în celulele provenite de la pacienții cu PWS și AS care prezintă deleții sau UPD.

Reglarea imprinting-ului implică deopotrivă elemente transcriptoare și cisactivatoare.

O altă dereglare care are multe caracteristici de imprinting comune cu PWS și AS, incluzând UPD, evitând transmiterea parentală a mutațiilor în anumite cazuri familiale, și a mutațiilor imprintate, este sindromul Beckwith-Wiedemann (BWS). Acest sindrom se caracterizează prin anomalii de creștere (hemihipertrofie — creșterea exagerată (gigantism) a unei părți a corpului, visceromegalie și macroglisie, exoftalmie, hipoglicemie în 10% dintre cazuri) (Lubinsky și colab., 1974; Niikawa și colab., 1986). Cele mai frecvente tumori ale copilăriei, în cadrul acestui sindrom sunt tumorile Wilms și carcinoame adenocorticale, cazuri rare de hepatoblastom și rhabdomiosarcoame. Aproximativ 85% dintre cazurile cu BWS sunt sporadice, restul de 15% fiind familiale și supuse unui model de ereditate autozomal — dominantă, cu transmitere dependentă de sex, respectiv maternală. Aceasta nu înseamnă localizarea pe heterozomi a determinanților genici, după cum nici expresivitatea variabilă a condiției nu este consecința eredității extranucleare. Singura explicație pentru asemenea violări ale legilor transmiterii caracterelor ereditare este intervenția imprinting-ului genomic. Locusul BWS are localizare 11p15 și a fost cartat prin analize de linkage ale cazurilor familiale de BWS, precum și prin detectarea anomaliilor cromozomale ale 11p15, în câteva cazuri sporadice de BWS.

În anumite cazuri sporadice, apare disomia uniparentală paternă pentru cromozomul 11 (Henry și colab., 1991). Între 5 și 10% dintre pacienții BWS sunt predisuși la tumori Wilms și alte tipuri de neoplazii, în care se remarcă pierderea preferențială a alelei materne din cromozomul 11p (Grundy și colab., 1991).

Implicarea imprinting-ului genomic în etiologia BWS a fost prima dată sugerată de transmiterea preferențial maternă a mutațiilor în familiile cu BWS. UPD patern al cromozomului 11p a fost observat în trei cazuri sporadice de BWS, confirmându-se astfel rolul imprinting-ului parental în dezvoltarea BWS. Izodisomia a fost detectată utilizând markeri din regiunea 11p15.5 care include și oncogena 1**ras** precum și genele pentru insulină și gena pentru factorul de creștere de tip asemănător insulinei 2 (IGF 2). Toate cazurile de UPD, din BWS, rezultă în cea mai mare parte dintr-un eveniment recombinațional mitotic, postfecundare. Un asemenea eveniment de recombinare poate necesita împerecherea omologilor din perechea 11, în cursul diviziunilor somatice. Interesant apare faptul că, în faza S târzie, din limfocitele normale, are loc o asociere fizică dintre regiunile omoloage 11p15.

Cazurile sporadice de BWS rezultate prin duplicația, inversia și translocația regiunii cromozomale 11p15 manifestă, de asemenea, efecte diferențiate legate de originea parentală. Segmentele 11p15 sunt exclusiv de origine paternă, pe când translocațiile balansate și inversiile sunt de origine maternă.

IGF 2 joacă un rol important în dezvoltare și se exprimă cu specificitate alelică paternă, în numeroase țesuturi fetale, neonatale și adulte. Expresia cu specificitate alelică a IGF 2 în ficatul fetal este controlată de promotorii alternativi. Transcriptele IGF 2 din promotorii P2, P3 și P4 prezintă expresie monoalelică, pe când expresia bialelică este realizată din P1. Acest pattern de expresie IGF 2 și de utilizare a promotorilor variază în cursul dezvoltării și are specificitate tisulară. Expresia monoalelică din toți cei patru promotori IGF 2 se observă în rinichii fetali, la 12 săptămâni de gestație; expresia bialelică din P1 este observată mai târziu, în cursul gestației. La 8 luni, după naștere, expresia IGF 2 în ficat este bialelică și promotor specifică, dar spre deosebire de ficatul fetal, se întâlnesc transcripte pentru toți cei patru promotori. La mușchii scheletici ai adultului, expresia IGF 2 pentru cei patru promotori este monoalelică. Alela maternă este inactivată în mai toate țesuturile embrionare, cu excepția plexului coroidal și leptomeningelui, în care gena este exprimată din ambele alele. Acestea reprezintă consecința evidentă a imprinting-ului genomic. Gena H19 este un candidat posibil imprintat patern, ca fenotip de suspensie a creșterii întâlnit în BXS și se află la aproximativ 100 Kb, în aval de IGF 2.

Expresia monoalelică a H19, la om, a fost demonstrată în numeroase organe fetale precum rinichi, inimă și creier. Alela transcrisă a genei H19 este de origine maternă în rinichi. Expresia monoalelică a IGF 2 a fost observată în placente, în care are loc, o expresie a H19 și IGF 2, în vili corionici, și a fost investigată prin hibridizare in situ, cu ARNm. Transcripția IGF 2 a fost detectată în trofoblastele intermediare care au prezentat, de asemenea, nivele înalte de expresie bialelică a genei H19.

Nu s-a clarificat dacă H19 se asociază cu fenotipul de predispoziție la tumorigeneză în BWS.

Constatarea pierderilor nerandomice ale alelelor cromozomului 11 matern în tumorile Wilms a reprezentat primul indiciu că fenomenul de imprinting ar putea juca un rol anume în tumorigeneza Wilms. Există doi loci de predispoziție la tumori Wilms (WT) care se cartează pe cromozomul 11p: una localizată 11p13 și alta localizată 11p15.5. Prima genă este desemnată WT1 și codifică pentru un factor de transcriere cu zinc-finger. Mutația acesteia a fost localizată în 10-15% din tumorile Wilms. Expresia monoalelică a acesteia a fost evidențiată în creier fetal și unele placente, în care se exprimă preferențial alela maternă WT1. Faptul că IGF 2 și H19, care sunt transcrise dintr-una din cele două alele în rinichii normali, și care prezintă expresie bialelică în WT, a reprezentat prima dovadă moleculară că imprinting-ul anormal ar putea fi asociat cu cancerul uman. În unele cazuri s-a înregistrat o pierdere sau o relaxare a imprinting-ului lui IGF 2 și mai rar al H19, asociată cu tumora Wilms. În probele WT în care este o pierdere a imprinting-ului (LOI) pentru IGF 2, se observă nivele crescute de ARNm IGF 2, pe când expresia lui H19 este abia detectabilă. H19 este transcrisă în acele probe WT în care expresia lui IGF 2 este monoalelică. Aceste modele de expresie cu specificitate alelelică IGF 2 și H19, în WT, sunt conforme modelului competiției enhancer-ului. Dacă H19 funcționează ca supresor tumoral, rămâne să fie determinat, deși s-a demonstrat că tumorigenitatea liniilor celulare WT și rhabdomiosarcoamelor poate fi supresată prin introducerea lui H19 și prin nivele înalte de expresie ale acesteia. De altfel, o regiune proximală a lui IGF 2/H19 conține, de asemenea, o genă supresoare a rhabdomiosarcomului, ceea ce sugerează un rol pentru gene adiționale sau distincte de supresie tumorală.

Trei gene adiționale candidate pentru supresie tumorală au fost cartate în regiunea BWS, la 11p15.1-5. Un alt candidat potențial, localizat în 11p15, este p57KIP2, un inhibitor al kinazei dependente de ciclină și reglator negativ al proliferării celulare. Gena umană p57KIP2 este exprimată preferențial din alela maternă în numeroase țesuturi fetale, plămâni și rinichi adult. În plus, alela maternă a genei p57KIP2 prezintă expresie redusă în cancere pulmonare și expresie redusă a acestei gene se înregistrează în tumora Wilms.

Pierderea imprinting-ului genelor, incluzând, printre altele și genele pentru IGF 2 și H19, se asociază cu tumori Wilms și alte cancere. Dereglarea imprinting-ului afectează dezvoltarea normală, ceea ce determină sindroame complexe precum PWS, AS și BWS. Imprinting-ul este dovedit și la gena receptorului factorului de creștere tip 2, asemănător insulinei (IGF 2R), genele BCR și ABL disrupte în translocația 9;22, caracteristică cromozomului **Philadelphia**, precum și pentru protooncogena N-myc. Neuroblastomul în stadiul avansat se asociază frecvent cu amplificarea protooncogenei N-myc și cu pierderea heterozigozității în 1p. Amplificarea N-myc este preferențial de origine paternă. O a doua genă supresoare de tumori exprimată matern poate fi inactivată în neuroblastom cu N-myc în copie unică. Rolul imprinting-ului genomic a fost evidențiat și pentru alte gene precum gena diabetului mellitus insulino-dependent și dereglării afective bipolare, constatându-se statistic un efect parental în transmiterea susceptibilității la boală.

În cazul sindromului ereditar de distrofie musculară miotonică (MMD) apare fenomenul de ANTICIPAȚIE GENETICĂ care înseamnă că **fenomenul unei dereglări (tabloul clinic, simptomatologic al unei boli) devine din ce în ce**

mai sever, cu fiecare generație care moștenește gena ce stă la baza acelei dereglări.

În 10% din familiile afectate de MMD, dereglarea este mai severă și adesea la o vârstă fragedă dacă GENA ESTE MOȘTENITĂ PE LINIE MATERNĂ (Harper, 1975), ceea ce este un indiciu al imprinting-ului genomic.

Debutul juvenil al bolii Huntington (HD) prezintă un mod imprintat de ereditate, de vreme ce aceasta este mai comună la descendenții taților afectați (Clarke și Bundey, 1990; Reik, 1988).

Retardația mentală, legată de X fragil, se transmite ca o trăsătură X-lincată, dar probabilitatea de a fi afectați descendenții crește în generațiile ulterioare ale unui pedigreu, fenomen care a fost numit **„Paradoxul Sherman“** (Sherman și colab., 1984, 1985). Genele implicate în toate aceste dereglări conțin regiuni cu repetiții ale unui triplet caracterizate prin înaltă instabilitate și care sunt cu atât mai extinse, cu cât gravitatea simptomatologiei este mai mare (Harley și colab., 1992; MacDonald și colab., 1993; Yu și colab., 1991).

Deși, în aceste cazuri, efectele patologice sunt condiționate de evenimente genetice și mai puțin de procese epigenetice, caracteristicile acestor boli se supun criteriilor unui imprinting genomic, deoarece fiecare locus genic implicat în boală este afectat în mod diferențiat, după ce traversează gametogeneza femelă sau gametogeneza masculă. În distrofia musculară miotonică, ca și în sindromul X-fragil, expansiunea repetițiilor tripletului care conduce la fenotipul patologic are loc numai prin transmitere pe linie femelă (Fu și colab., 1991, 1992). Efectul transmiterii cu specificitate parentală a repetiției tripletului din boala Huntington va trebui să fie mai mult analizat, deoarece gena implicată într-o asemenea dereglare, a fost descoperită recent (MacDonald și colab., 1993).

Imprinting-ul care afectează susceptibilitatea la MMD, este evidențiat și prin observarea concretă a reducerii numărului de repetiții ale trinucleotidului în condițiile transmiterii pe linie paternă a genei mutante MMD, la descendența neafectată (Brook, 1993).

Diferențe care își au sorgintea în părintele care transmite dereglarea s-au observat și în alte boli precum ataxia cerebelară (Harding, 1981), ataxia spinocerebelară (Zoghbi și colab., 1988), boala crizelor epileptice nespecifice (Ottman și colab., 1988), sindromul Goldenhar, sindromul Adams-Oliver, psoriazis, tumori familiale glomoase, defecte de tub neural, boala congenitală a cordului și narcolepsie (Paterson și Sapienza, 1993).

4. TRĂSĂTURI CARACTERISTICE GENELOR AMPRENTATE (IMPRINTATE) ȘI MECANISMELE IMPRINTING-ULUI GENETIC/GENOMIC

Genele amprentate nu sunt distribuite uniform, concluzie bazată pe datele experimentale obținute de Cattanach și colaboratorii (1982, 1985, 1991) precum și de Searle și Beechei (1978, 1985, 1990) prin care au demonstrat că pot fi menținute de la un singur părinte ambele exemplare ale unor autozomi, fără efecte deletorii.

Identificarea genomurilor amprentate a fost anevoioasă. Prima genă imprintată la șoarece nu a fost o genă endogenă, ci o transgenă care a prezentat expresie specific paternă, în inimă (Swain și colab., 1987; Chaillet și colab., 1991, 1995). În anul 1991 a început identificarea genelor endogene imprintate și anume a genei factorului de creștere 2, asemănător insulinei (**IGF 2**). Dechiara și colaboratorii (1991) au observat că o mutație țintită în gena ce codifică pentru acest factor de creștere, esențial pentru dezvoltarea fătului, se exprimă sub forma unui fenotip de pitic la heterozigot, dar numai atunci când gena este moștenită de la tați, nu și de la mame, având loc o reducere cu 40% a dimensiunii nou-născuților. Acest defect de creștere a fost identic atât la heterozigoți cât și la homozigoții paternali, ceea ce înseamnă că tatăl a contribuit cu întreaga activitate a genei **IGF 2**. Această concluzie a fost confirmată și prin aplicarea metodelor moleculare și astfel **IGF 2** a devenit prima genă identificată a fi imprintată. Ulterior, au fost identificate numeroase gene imprintate, atât la om cât și la șoarece. Această genă se mai numește gena receptorului monoză-6-fosfat, de tip 2. Sensul expresiei că genele sunt exprimate patern sau matern este acela că gena este exprimată dacă este moștenită de la tată, respectiv de la mamă. Până în prezent au fost identificate trei gene exprimate patern, în cadrul proiectului de clonare pozițională a cromozomului uman 15q, o regiune implicată în sindroamele Prader-Willi și Angelman. Ambele sindroame sunt exemple tipice de boli cu efecte dependente de originea parentală, de vreme ce formele ereditare, dominant-autozomale pot fi transmise numai de la unul din părinți, pe când cazurile sporadice sunt asociate cu izodisomii uniparentale ale regiunii. Cele trei gene imprintate, identificate în această regiune, SNRPN, IPW și ZNF127 sunt imprintate patern și sunt astfel gene candidat pentru contribuția lor la etiologia sindromului Prader-Willi, caracterizat prin ereditate paternă și izodisomii materne.

Alte gene amprentate au fost identificate prin cercetări sistematice la nivel genomic, pentru gene expresate monoalelic. O cercetare elegantă a fost realizată pe baza asocierii genelor imprintate cu metilarea, cu specificitate de alelă a ADN și a resturilor CpG. Această metodă se numește *metoda scanării* sau a *baleiajului* *genomic cu marcaje de restricție* (RLGS) și ea a permis identificarea la șoarece a genelor imprintate U2afbp-rs și GNF1. Până la sfârșitul secolului XX erau identificate 19 asemenea gene imprintate.

Genele imprintate au o caracteristică importantă și anume gruparea lor în clusteri genici. În genomul uman, cea mai mare grupare de gene imprintate se află la capătul proximal 11p15.5, unde se află șase asemenea gene, într-o regiune de 115 megabaze ADN . La un capăt al cluster-ului se află trei gene expresate matern, desemnate **p57KIP2, KvLQT1** și **Mash2.** În mijlocul clusterului se află două gene exprimate patern, desemnate **Ins-2** (de la **Insulin 2**) și **IGF 2,** iar la 90 Kb, în aval, este gena **H19,** exprimată matern.

Un alt cluster de gene imprintate la om este localizat în cromozomul 15, acolo unde se localizează markeri pentru sindroamele Prader-Willi și Angelman. Regiunea aceasta conține gena **ZNF127** care codifică o proteină ce conține zinc-finger, gena fiind așezată la capătul dinspre centromer al cluster-ului. La aproximativ 1 Mb mai departe se află gena **SNRPN** care codifică pentru o proteină nucleară implicată în procesarea ARN, iar la 100 Kb, în aval, se află gena **IPW** care, asemănător lui H19, pare a codifica un ARN. În afara acestor trei gene, bine caracterizate, tot în această regiune au fost cartate două EST-uri cu specificitate paternă, neștiindu-se clar dacă ele reprezintă gene sau transcripte ale SNRPN și IPW (Suclife și colab., 1994). În acest cluster ar trebui să fie și gene exprimate matern, de vreme ce sindromul Angelman este moștenit exclusiv de la mame, iar cazurile sporadice adesea prezintă izodisomii paterne, ceea ce sugerează că boala este consecința absenței uneia sau a mai multor gene exprimate din cromozomul de origine maternă. O genă candidat pentru sindromul Angelman este gena **UBE3A** care codifică pentru E6-AP ubiquitin-protein-ligază, proteină identificată inițial prin asocierea sa cu proteina E6 a virusului papilomei la om și care ar provoca dereglarea proteinei p53.

Cel mai mare cluster de gene imprintate este însuși cromozomul X inactivat la mamiferele euteriene prin mecanismul compensației de doză a genelor X-lincate (lionizare). Deși mecanismul inactivării X implică o alegere randomizată a cromozomilor X de origine maternă și de origine paternă, în celulele embrionare, alegerea este determinată parental în cursul embriogenezei timpurii în celulele liniilor extraembrionare, așa cum sunt trofoblastele placentei și endodermul visceral al sacului vitelin, în sensul că este preferențial inactivat cromozomul X de origine paternă, genele sale fiind silențiate. Singura excepție este gena codificatoare de ARN, numită gena Xist care se cartează în centrul de inactivare X și care este exprimată în exclusivitate din cromozomul X patern, silențiat (Bockdorff și colab., 1991; Brown și colab., 1991). Astfel, imprinting-ul acestei gene este opus tuturor celorlalte gene din cromozomul X.

Cei trei clusteri genici supuși imprinting-ului prezintă o distribuție caracteristică genelor imprintate pe o distanță mare. În imprinting este caracteristică însă interspersia genelor exprimate matern, cu cele exprimate patern.

Aceste trăsături comune sugerează că mecanismul imprinting-ului nu este unul local sau cu specificitate genică, ci, mai curând, el funcționează pe distanțe mari, posibil de multe zeci de kilobaze.

Pe lângă cele trei trăsături comune ale genelor imprintate se mai remarcă și replicarea asincronă a lor, evidențiată clar, în cazul cromozomului X inactivat care prezintă replicare mai tardivă în ciclul celular, față de cromozomul X activ. Utilizând tehnica FISH, Kitsberg și colaboratorii (1993) au demonstrat pentru prima dată că genele imprintate se replică asincron, în cursul stadiului S al ciclului celular. Înainte de replicare se observă două semnale (pete) de hibridizare, corespunzătoare celor doi cromozomi parentali. Cromozomul replicat apare cu două pete strâns spațiate. Asincronia este cuantificată ca procent de celule cu un model de marcaj de tip o pată/două pete. Utilizându-se acest criteriu s-a constatat că pentru genele **IGF 2r**, **IGF 2**, **H19** și **Snrpn**, cele două alele parentale au fost replicate asincron, alela paternă fiind replicată timpuriu. Această concluzie a fost sprijinită și de investigațiile din cadrul clusterului de gene exprimate patern în sindromul Prader-Willi, la care asincronia este extinsă pe o regiune de 650 Kb, cromozomul de origine paternă replicându-se mai timpuriu decât cel de origine maternă.

Programarea în timp a replicării în cadrul ciclului celular se corelează adesea cu nivelul de expresie genică, replicarea timpurie asociindu-se cu activitatea genică. Alegerea alelei cu replicare timpurie pentru genele imprintate nu se supune acestei reguli generale, de vreme ce atât **H19** cât și **IGF 2r** sunt exprimate matern, deși alela paternă este replicată timpuriu. În schimb, în cadrul unui număr mic de gene care au fost exprimate, apare că indiferent de alela care a fost exprimată, alela paternă are replicare timpurie. Marcarea pulsatorie a celulelor cu bromodeoxiuridină (BrdU) a permis să se determine direct, cantitativ, rata de încorporare a acestui analog al timinei în ADN, pentru alelele **IGF 2** și **H19** care se replică tardiv în ciclul celular din limfoamele umane și liniile celulare limfoide. Aceste celule nu exprimă nici una din aceste gene, ceea ce ridică problema posibilității că asincronia necesită expresia genei active pe unul din cromozomi. Totuși, analiza FISH s-a efectuat atât pe celule care exprimă genele cât și pe celulele care nu exprimă genele, incluzând o linie celulară limfoblastoidă, umană.

Capacitatea imprinting-ului genomic de a conferi diferite stări structural-funcționale ale cromozomilor de origine maternă sau paternă este sugerată de observația că atât regiunea Prader-Willi/Angelman cât și regiunea IGF 2 — H19 prezintă o rată de recombinare meiotică mult mai mare, la bărbați, față de femei, spre deosebire de alte regiuni ale genomului uman în care aceste rate sunt comparabile. O situație similară se întâlnește în cazul genei WT-1.

Încă de la descoperirea primului imprinting genomic, în cazul genei **IGF 2**, a fost evident că acest mecanism poate fi reglat într-o manieră cu specificitate tisulară, în cazul dezvoltării. Gena umană **KvLQT1** este exprimată matern în majoritatea țesuturilor, cu excepția inimii (Lee și colab., 1997). Mutațiile acestei gene sunt responsabile de sindromul QT lung, o aritmie cardiacă moștenită ca o boală autozomal dominantă. Această genă nu manifestă îngrădiri parentale în moștenire, probabil că ea nu este imprintată în inimă. În cazul genei umane **IGF 2**, în cursul dezvoltării, expresia sa este realizată de la nivelul a trei promotori separați, a căror activitate este restrictată la cromozomul patern. După naștere, în ficat este activat un promotor distal, pe ambii cromozomi, ceea ce conduce la o expresie predominant bialelică, la adult. Astfel, imprinting-ul genei umane IGF 2 are specificitate de promotor. Interesant apare faptul că gena **Igf 2**, de la șoarece, este lipsită de promotorul distal și, ca urmare, amprentarea sa nu este relaxată în ficatul postnatal.

În contrast cu această genă **Igf 2**, genele **H19** și **Snrpn**, de la șoarece, sunt permanent amprentate, în toate stadiile de dezvoltare. La om, celule ocazionale scapă amprentării **H19**, în trofoblastele placentei, în dezvoltarea timpurie, dar imprinting-ul devine complet, în stadiile ulterioare. Celulele germinale, în care marcajul epigenetic care definește diferența dintre alele a fost pierdut, după toate probabilitățile, constituie singura excepție de la aceată regulă.

Există multe similitudini, dar și deosebiri, în imprinting-ul genomic, la șoarece și la om. De exemplu, imprinting-ul genelor **H19**, **Igf 2**, **p57 KIP2** și **Snrpn**, de la șoarece, este conservat și la om, pe când gena **IGF 2R** este în mare măsură bialelică, la om, deși sunt și raportări care sugerează expresia monoalelică a IGF 2R. Această genă care codifică o proteină înrudită cu factorul de *splicing*, și care este desemnată **U2a fbp-rs**, este imprintată la șoarece, dar nu și la om. Unele gene imprintate codifică deopotrivă pentru proteine și pentru ARN. Alte gene imprintate nu codifică pentru proteine, dar codifică pentru ARN conservat. Acesta este cazul genei **H19**, identificată într-un număr de analize a cADN diferențial. ARN H19 rămâne, așadar, netradus. ARN se acumulează la nivele foarte mari, în cursul dezvoltării fetale, în țesuturile de origine mezodermică și endodermică. Când s-a constatat că genele imprintate codificatoare de ARN, desemnate **Xist**, la șoarece, și **XIST**, la om, se cartează în centrul de inactivare a lui X care reprezintă o regiune din cromozomul X, necesară a fi prezentă în **cis**, pentru inactivarea acestui cromozom, s-a trezit interesul cercetătorilor, considerându-se că ARN-urile au un rol deosebit în însuși procesul de imprinting (Brockdorff și colab., 1991; Brown și colab., 1991). Transcripția sa selectivă din cromozomul X patern, inactiv, în celulele extraembrionice, pune această genă, în mod clar, în clasa genelor amprentate.

Cele două gene codificatoare de ARN au primul și ultimul exon mari, între care există numeroși exoni mici. Aceste gene sunt conservate în linia euterienelor. ARN codificat prezintă structură secundară extensivă cu pattern-uri de schimbări compensatorii de baze în structurile tulpinale ale buclelor potențiale. Asemenea caracteristici sugerează că fiecare ARN are o funcție biologică oarecare, aflată sub presiune selectivă, în cursul evoluției. În anul 1994, Wevrick și colaboratorii au identificat gena pentru un al treilea ARN amprentat, pe care au desemnat-o IPW, cartată în regiunea Prader-Willi. Această genă este exclusiv exprimată din cromozomul de origine paternă și prezintă omologie redusă, de numai 500 bp cu gena omoloagă de la șoarece, regiunea de omologie întinzându-se la nivelul unei joncțiuni exon-intron.

Problema centrală a imprinting-ului genomic este legată de modalitatea în care alelele parentale ale genelor amprentate sunt desemnate, adică marcate, astfel ca să fie determinat un pattern corespunzător de expresie în organismul aflat în dezvoltare. În primul rând, marcajul trebuie să fie stabilit în gameți, deoarece în asemenea celule, alelele se află în compartimente separate și pot fi modificate în mod diferențiat. În al doilea rând, marcajul alelic trebuie să fie stabil menținut după fecundație, în toate țesuturile în care imprinting-ul este recunoscut. În al treilea rând, modificarea care stă la baza imprinting-ului trebuie să fie anulată și reordonată, în cursul producerii celulelor germinale, astfel încât să se poată realiza un nou imprinting, cu specificitate de sex, spre a fi transmis descendenței.

Cea mai bună cale de realizare a marcajului alelic este metilarea restului citozină din dinucleotidul CpG. Este un marcaj epigenetic, deoarece propagarea metilării citozinei este ușor realizată cu ajutorul enzimei ADN metilază. Această enzimă metilează ADN semi-metilat, la nivelul bifurcației de replicare. În plus, această modificare epigenetică a fost asociată cu represia genelor în cromozomul X inactiv, la femela mamiferelor, ca și cu starea inactivă a genelor ce prezintă specificitate tisulară și a transgenelor silențiate (Doerfler, 1991; Eden și Cedar, 1994; Monk, 1995; Riggs și Pfeifer, 1992).

Până în prezent, diferențele cu specificitate alelică în metilarea ADN au fost evidențiate în vecinătatea celor mai multe gene amprentate. Metilarea este cel mai adesea apreciată pe baza comportamentului endonucleazelor de restricție care sunt sensibile la starea de metilare a resturilor de citozină de la nivelul secvenței lor de recunoaștere, așa cum este cazul Hpa II și Hha I. Dar, cum aceste citozine reprezintă un procent redus de citozine localizate în dinucleotidele CpG, a existat o mare probabilitate ca regiunile de metilare diferențiată să fi fost minimalizate sau chiar neidentificate. O imagine mult mai completă a nivelului de metilare, realizat la un anumit locus genic, este obținută printr-o metodă recentă, bazată pe mutageneza bisulfitică/secvențierea genomică, prin care starea de metilare este detectată la nivelul tuturor resturilor de citozină din cadrul unei regiuni date a duplexului ADN (Feil și colab., 1994; Treblay și colab., 1997; Zeschnigk și colab., 1997).

Unele gene, precum H19 și SNRPN, care prezintă metilare cu specificitate alelică, respectă paradigma stabilită de studiile privind expresia genică, fiind metilate pe alelele represate (Ferguson-Smith și colab., 1993; Glenn și colab., 1993). Într-o situație asemănătoare se află gena exprimată patern, **Igf 2**, care prezintă metilare cu specificitate alelică paternă 5', față de promotorii din regiunea 3' a genei (Feil și colab., 1994; Sasaki și colab., 1992). Nivelul metilării este variabil de la genă la genă. De exemplu, în celulele somatice, gena **H19** este metilată pe alela represată patern, la nivelul unei regiuni de 8 Kb, pe când gena **Igf 2r** are două regiuni independente de metilare diferențiată de 1,7 Kb și 1,8 Kb (Bartolomei și colab., 1993; Stoger și colab., 1993).

Rezultă că metilarea diferențiată a fost evidențiată în orice poziție aflată în vecinătatea genelor amprentate, din promotori, introni și exoni, până la nivelul unor regiuni situate distal, față de unitatea de transcripție.

Deși metilarea are un marcaj alelic dovedit al imprinting-ului genomic, modelele heterogene de metilare nu sugerează un mecanism simplu prin care marcajul stabilește pattern-urile diferențiate de expresie genică.

Prezența pattern-urilor de metilare alelică în celulele somatice sugerează, dar nu dovedește, faptul că metilarea este implicată în expresia monoalelică a genelor amprentate. Cea mai convingătoare demonstrație a importanței metilării ADN pentru imprinting-ul genomic este adusă de analiza șoarecilor la care a fost deletată gena pentru ADN metilază (**Dnmt**). Șoarecii deficienți în această genă mor în stadiul de 8 somite, în cursul embriogenezei. Jaenisch și colaboratorii săi (1993, 1995) au determinat la embrionii mutanți, înainte de moartea acestora, că **H19** și **Xist**, care sunt metilate pe alelele active, au fost represate. Acest experiment dovedește cu claritate că metilarea ADN este cerută pentru menținerea diferenței dintre alelele parentale în celulele somatice. NU SE ȘTIE CU CERTITUDINE DACĂ METILAREA ESTE EA ÎNSĂȘI IMPRINTUL GAMETIC INIȚIAL. Pentru ca metilarea să aibe un asemenea atribut, diferența în metilare trebuie să fie moștenită din gameți și menținută stabil în cursul dezvoltării timpurii.

Metilarea cu specificitate de alelă maternă a Igf 2r, SNRPN și Xist, ca și metilarea alelei paterne a genei H19 sunt moștenite exclusiv dintr-un gamet și reprezintă, în consecință, marcaje potențiale de imprinting (Bartolomei și Tighman, 1997).

Dimpotrivă, metilarea regiunii promotoare a genei **Igf 2** nu poate acționa ca semnal de imprinting, deoarece ea este prezentă în gameții ambilor părinți (Brandeis și colab., 1993). Tot astfel, marcajul imprinting-ului nu poate sta în promotorii diferențiat metilați ai genelor **Igf 2r** și **U 2a fbp-rs**, de vreme ce metilarea alelelor represate este dobândită după fecundație.

Pentru ca un semnal CpG să servească ca imprint gametic, este esențial ca aceasta să supraviețuiească dezvoltării preimplantării, perioadă în care embrionul suferă demetilare generalizată (Sanford și colab., 1987; Monk și colab., 1987). Analizele fine PCR, cu specificitate alelelică, au arătat că o mare parte a metilării moștenite din gameți a fost anulată în cursul dezvoltării preimplantare, ceea ce a fost considerat ca argument în afirmația că aceste resturi diferențiat metilate nu pot funcționa ca marker de imprinting. Singura excepție o constituie dinucleotidele CpG localizate în intronul **Igf 2r**, regiunea din amonte a **H19**, apoi promotorul și porțiunea 5' a genei **Xist**, toate fiind rezistente la demetilarea globală din embriogeneza timpurie. Aceste resturi diferențiat metilate satisfac toate criteriile marcajului imprinting-ului.

Imprinturile gametice nu numai că rezistă la demetilare, dar ele rezistă și la remetilare, ceea ce este o condiție necesară, dacă alela nemetilată trebuie să-și păstreze identitatea sa în celulele somatice.

METILAREA ADN ARE UN ROL EVIDENT, CLAR, ÎN MENȚINEREA DIFERENȚEI DINTRE ALELELE GENELOR SUPUSE IMPRING-ULUI GENOMIC ÎN CELULELE SOMATICE ȘI RĂMÂNE CANDIDATUL CEL MAI PROBABIL ÎN STABILIREA AMPRENTĂRII PRIMARE, ADICĂ ÎN INIȚIEREA IMPRINTING-ULUI.

Celulele germinale primordiale ca și toate celulele care derivă din oul fecundat, posedă alelele moștenite ale genelor imprintate, atât de la mamă, cât și de la tată. După terminarea gametogenezei, codul biparental a fost înlăturat și restabilit identic pe ambii cromozomi pentru transmiterea la următoarea generație. În cursul dezvoltării celulelor germinale, genele sunt relativ nemetilate. Singurul situs care poate fi candidat pentru marcajul gametic a fost identificat în cadrul unei regiuni intronice a **Igf 2r**. Acesta s-a dovedit a fi nemetilat, în ovocitele mature, la femele adulte, ceea ce este interpretat în sensul unei înlăturări timpurii a marcajului gametic anterior și al unei restabiliri relativ târzii a acestuia în gameți.

Totuși nu se cunoaște cum cele două linii germinale stabilesc diferitele marcaje cu specificitate genică. Aceasta ar putea fi realizată, fie prin metilaze de novo, specifice ovulelor, respectiv spermatozoizilor, fiecare capabilă de a recunoaște diferențele dintre regiunile imprintate gametic specifice femelei, respectiv masculului, fie prin acțiunea unor modificatori sau inhibitori cu specificitate de linie germinală ai unei metilaze ADN noi, de tip constitutiv, dar până în prezent, la mamifere nu s-a identificat o metilază de novo.

Cum poate ca metilarea ADN să determine expresia diferențiată a genelor amprentate? Cel mai simplu caz este cel al unei alele inactive, care este hipermetilate. În acest caz, metilarea acționează direct, prin inhibiția transcripției.

Metilarea ADN poate îndepărta direct factorii de transcripție care devin incapabili de a se lega la ADN, atunci când resturile de citozină din situsurile lor de recunoaștere sunt metilate. Proteinele AP-2, E2F și c-Myc s-au dovedit a fi sensibile la citozină, când acestea se află în situsurile lor de legare cognate (de recunoaștere) din ADN (Tate și Bird, 1993). Cum aceste situsuri sunt în mod tipic, înglobate în insule CpG, libere de metilare, factorii de transcripție nu au nici o problemă cu metilarea CpG, în mod normal, cu excepția alelelor metilate ale genelor amprentate și a cromozomului X inactivat (silențiat). Există alternativa ca metilarea ADN să atragă proteine care inhibă transcripția, așa cum sunt MeCP1 și MeCP2, două proteine care se leagă la ADN ce conține dinucleotidul CpG metilat. Silențierea genelor se poate realiza și prin metilarea ADN ce are loc, nu neapărat în cadrul regiunilor de control transcripțional ale genelor supuse silențierii, metilarea ADN având efect indirect, așa cum au demonstrat Kass și colaboratorii săi (1997), într-un experiment de transfecție tranzientă a ovocitelor de **Xenopus laevis**, prin care au dovedit că metilarea ADN poate induce o asamblare în timp a complexelor nucleoproteinice represive pe ADN nud. Neumann și colaboratorii (1995) au evidențiat asocierea dintre regiunile amprentate gametic, bogate în CpG, ale mai multor gene amprentate și repetiții de secvențe simple. Secvențele diferențiat metilate, bogate în CpG, din genele **Xist**, **Igf 2r**, **H19**, **U2 afbp-rs** și **p57 KIP2** conțin repetiții directe sau se află în imediata vecinătate a regiunilor care sunt bogate în asemenea secvențe. Aceste repetiții nu au omologie, unele cu altele, sau cu secvențele repetitive comune, întâlnite la mamifere. De fapt, chiar și între gena **H19**, de la om, la nivelul regiunii imprintate gametic sau al elementelor repetitive adiacente din regiunea de flancare 5' și elementul repetitiv al genei H19, de la șoarece nu apare omologie. Acesta de pe urmă este scurt, bogat în G și repetat de multe ori, în cadrul unei regiuni de 400 pb, pe când, la om, gena **H19** are mai multe copii ale unei repetiții mari de 400 pb. Această constatare este surprinzătoare, având în vedere că regiunea în discuție a fost clar implicată ca imprint gametic la gena de la șoarece H19. Deși imprintul gametic la gena umană H19 poate fi oriunde, pare mai probabil că nu atât secvența primară a imprinturilor gametice este esențială în acest proces, cât mai ales unele aspecte ale structurii care nu sunt încă deslușite.

O situație asemănătoare este înregistrată la genele IGF 2r, de șoarece, și IGF 2R, de la om.

Nu s-a putut elucida rolul elementelor repetitive în realizarea imprinting-ului gametic, dar se presupune că repetițiile ar putea orienta aparatul de „marcaj“ spre alela corespunzătoare, prin asamblarea unei structuri terțiare a ADN, unice pentru una din liniile germinale. Afirmația se bazează pe ceea ce se cunoaște de la ciuperca **Neurospora crassa**, la care mutanta RIP (*Repeat Induced Point mutation*) prezintă secvențe repetate metilate, silențiate și cu mutații în cursul fazei sexuale. Un fenomen similar numit MIP (*Methylation-Induced Premeiotically*) este întâlnit la ciuperca înrudită **Ascobolus immersus**. Transgenele repetate la planta **Arabidopsis thaliana** sunt eficient silențiate prin metilare ADN, fenomenul apărând chiar și atunci când transgenele sunt asemănătoare.

Se consideră că metilarea repetat indusă și silențierea de gene la aceste organisme constituie elemente ale unui mecanism străvechi de apărare împotriva invaziei paraziților.

Dorer și Henikoff (1994) consideră că repetițiile de secvență au o funcție somatică la **Drosophila**, organism lipsit de mecanismul metilării CpG. Ei au demonstrat că împerecherea unor copii multiple, strâns lincate a unei transgene, conduce la formarea heterocromatinei. Potrivit opinei acestor autori, secvențele repetate produc structuri pliate, recunoscute de proteine cu specificitate pentru heterocromatină. La mamifere, metilarea ADN amplifică formarea unor asemenea structuri heterocromatice, demonstrându-se că metil–CpG modifică structura ADN, favorizând o formă diferită de forma B a ADN. Legarea proteinelor cu specificitate heterocromatică la ADN de conformație modificată, cum ar fi ADN -Z, care apare a fi în mod particular stabilizat prin metil-CpG, ar putea fi întărită, ceea ce conduce la silențierea genelor amprentate.

Funcția marcajului epigenetic în imprinting-ul unor gene, precum gena **H19**, la care alela silențiată este metilată, este de înțeles, dar mai greu de explicat este imprinting-ul unor gene, precum gena **Igf 2r**, la care metilarea ADN derivată din gamet apare în cromozomul care este activ transcris și pierderea metilării conduce la silențierea genică. S-a sugerat că pentru Igf 2r metilarea maternă ar putea bloca legarea represorului transcripțional și, ca urmare, este permisă transcripția (Stoger și colab., 1993; Watt și Molloy, 1988). Tot astfel, gena **Igf 2** este selectiv metilată pe alela sa activă în două regiuni: flancul 5' și în cadrul genei însăși.

După opinia lui Bartolomei și a lui Tilhman (1992), imprinting-ul **Igf 2** a fost dependent de metilarea lui **H19** și nu a sa însăși, deoarece **Igf 2** și **H19** sunt exprimate foarte similar, dacă nu identic, în cursul embriogenezei.

Marcajele epigenetice ca reglatori ai interacțiunilor promotor și *enhancer* oferă o explicație atractivă pentru specificitatea temporală și spațială a imprinting-ului. Acestea ar putea fi reprezentate de plasarea unui promotor competitiv sau a unui hotar cromatinic care obstrucționează un anumit *enhancer* cu specificitate de țesut, fapt evidențiat în exprimarea genei **Ins-2**.

Exprimarea acesteia în endodermul visceral necesită *enhancerii* **H19 3'**, iar silențierea sa necesită prezența genei **H19**, pe flancul său, gena **H19** acționând ca o piedică între *enhanceri* și gena **Ins-2**. În pancreas, unde **Ins-2** este exprimată bialelic, există un enhancer cu specficitate pancreatică, aflat exact 5' față de genă și care este activat și în virtutea poziției sale, este imun față de influența genei **H19**. Acest model prezice că genele amprentate nu dobândesc pattern-ul bialelic, de expresie, ci expresia lor este guvernată de elemente reglatoare discrete, al căror acces la promotor este reglat la distanță de marcajele epigenetice.

Generalizarea modelului permite să se tragă concluzia că genele amprentate sunt încadrate în două clase: 1) gene reglate direct, prin metilarea ADN, așa cum este **H19**, vor fi activate prin metilarea ADN, posibil prin metilarea directă a promotorului; 2) gene, precum **Ins-2** și **Igf 2**, vor fi activate prin metilarea ADN, în virtutea unui mecanism indirect ce implică o altă genă și/sau un element de hotar cromatinic (insulator).

În acest caz, pierderea metilării nu va activa ci, dimpotrivă, va silenția gena. Gena **Igf 2r** este metilată pe cromozomul activ și silențiată prin pierderea metilării.

Analiza mutațiilor la om, la nivelul 11p15.5, arată că există control adițional asupra genei imprintate **IGF 2**, altul decât la **H19**. Analiza moleculară la pacienții cu sindrom Beckwith-Wiedermann, în care apar numeroase defecte, incluzând gigantism, macroglosia, exocefalie și tumori frecvente în copilărie, la ficat, rinichi și mușchi, a permis identificarea unui subset mic de persoane cu translocații balansate în această regiune.

Clusterul de puncte de rupere se află în două regiuni, dintre care una în cadrul genei KvLQTI. La cel puțin unul dintre acești pacienți, expresia lui **IGF 2** este bialelică, fără schimbare în imprinting-ul genei **H19**. Astfel, o disrupere în structura cromozomului are un efect asupra imprinting-ului genei IGF 2, aflată la 100-200 Kb mai departe.

5. ROLUL ARN ÎN IMPRINTING

Prezența genelor pentru ARN-urile netraduse în cadrul a trei clusteri de gene amprentate ridică posibilitatea ca produșii acestor gene să joace un rol în imprinting. Mutațiile țintite asupra genei **Xist** (Marahrens și colab., 1997; Penny și colab., 1996) au determinat abolirea inactivării cromozomului X, dacă mutația se află în poziția **cis**, adică dacă mutația se află în cromozomul ce va fi inactivat. Mutația afectează selectiv celulele din linia extraembrionică, acestea fiind singurele celule care suferă inactivarea cromozomului X, într-un mod imprintat. Femelele transmit mutația **Xist** atât fiilor cât și fiicelor, deoarece cromozomul X matern rămâne activ în liniile extraembrionare.

În celulele somatice, în care alegerea este randomizată, toate celulele au inactivat cromozomul X patern, de tip sălbatic, probabil deoarece celulele care au încercat să inactiveze cromozomul X matern au murit. Tații, totuși, nu pot transmite mutații fiicelor, deoarece cromozomul X patern, mutant, nu poate fi inactivat în liniile extraembrionare, în care nu există alegere. În absența compensației de doză, linia extraembrionară eșuează să se dezvolte corect. Jaenisch și colaboratorii săi (1997) au numit acest proces *„moarte prin imprinting"*.

Acum se știe clar că gena **Xist** este cerută pentru inactivarea cromozomului X, dar nu se știa prin ce mecanism ARN însuși poate acționa ca moleculă silențiatoare, de vreme ce ARN XIST îmbracă sau „cosmetizează" cromozomul X inactiv, la om (Clemson și colab., 1996). Dar acestă funcție nu este cerută și de menținerea inactivării X, fapt dovedit de constatarea că hibrizii celulari somatici care păstrează fragmente de cromozomi X inactivi păstrează starea silențiată a acestora, chiar în absența genei **Xist.**

Alternativa este că doar transcripția genei Xist/XIST este suficientă pentru a se realiza o rapidă împrăștiere a heterocromatinizării bidirecționale, de-a lungul cromozomului X.

Implicarea ARN în procesul de imprinting este argumentată și de experiențele lui Weiss și ale colaboratorilor săi (1996) din care s-a dedus că activitatea de demetilare a ADN, identificată în extractele celulare, a fost înalt sensibilă la digestia RNazică. S-a dedus că locii genici imprintați care codifică pentru ARN își reglează propria metilare a ADN și deci propria lor amprentare în cis.

6. ASPECTE GENETICE ÎN EVOLUȚIA GENELOR AMPRENTATE

Deleții mici dinspre sectorul 5' al genei SNRPN, identificate la unii dintre pacienții cu sindrom Prader-Willi și sindrom Angelman au ca o caracteristică comună pierderea promotorului genei SNRPN și aceste deleții determină o silențiere necorespunzătoare a ZNF 127 și IPW, în **cis**, gene care stau la 1 Mb și respectiv la 150 Kb, de o parte și de alta a SNRPN. În plus, mutațiile afectează toate marcajele epigenetice ale regiunii amprentate, incluzând programarea în timp a replicării, asocierea cromozomilor și metilarea ADN. Studiile familiale arată că un tată care are o deleție nu poate reseta în modul parental a mutantă cromozomală moștenită de la mama sa și o transmite la descendenți în modul matern, asigurând silențierea și a altor gene.

Aceasta sugerează că în regiunea ce înconjoară promotorul SNRPN trebuie că există un semnal necesar pentru evenimentul de resetare, acest semnal lucrând peste multe sute de kilobaze de ADN, afectând direct sau indirect expresia multor gene.

Imediat în amonte de promotorul SNRPN, Dittrich și colaboratorii (1996) au identificat o serie de exoni 5' alternativi, numiți exoni BD care se unesc în corpul genei SNRPN și produc nivele scăzute de ARN prezumtiv netraduse.

Delețiile Angelman afectează preferențial acești exoni din amonte. Această boală este consecința unor mutații care au fost moștenite de la o mamă care nu a putut reseta cromozomul moștenit de la tată.

A fost elaborat un model care să explice imprinting-ul genomic din cadrul sindromului Prader-Willi și sindromul Angelman. Microdelțiile din aceste boli afectează genele distante, regiunea care cuprinde cele două seturi de mutații fiind numită „***centru de imprinting***“ (Dittrich și colab., 1996).

În cadrul acestui model, transcriptul exonului BD acționează ca un „imprintor“ în **cis**, în linia germinală maternă și schimbă cromozomul patern într-un epigenotip matern. Acesta acționează pe calea unui situs de inițiere a macazului care coincide cu promotorul SNRPN, spre a împrăștia o structură heterocromatică în toată regiunea, silențiind ZNF 127, IPW, SNRPN și imprintorul însuși. Replicarea tardivă a acestei regiuni în cromozomul matern este în acord cu existența unei structuri heterocromatice. În linia germinală masculă, transcriptul exonului BD este inactiv datorită probabil absenței unui produs genic specific liniei germinale materne, și ambii cromozomi parentali sunt transmiși în generația următoare, în stare eucromatică.

La pacienții cu sindrom Angelman, cu deleții în exonii BD, imprintorul nu poate fi realizat și ca urmare, cromozomul nu poate fi resetat într-o stare silențiată.

La pacienții cu sindrom Prader-Willi, în linia germinală masculă imprintoral este necesar spre a converti cromozomul matern într-o stare eucromatică.

Silențierea epigenetică a genelor autozomale face ca organismul să devină hemizigot pentru toate genele silențiate. Beneficiul organismului rezultat dintr-un asemenea mecanism transcripțional nu e ușor de înțeles. Spre deosebire de cazul inactivării cromozomului X care e ușor de înțeles a reprezenta un mecanism de egalizare a expresiei genelor X-lincate la femele XX și masculi XY, imprinting-ul genomic pare a fi un mecanism greu de înțeles pentru reglarea expresiei genelor autozomale. Genele implicate în dezvoltare și mai ales în creșterea fetală sunt cele mai bine studiate, din punct de vedere a imprinting-ului genomic. Disomiile uniparentale pentru numeroși cromozomi conduc la anomalii în creștere, disomiile paterne promovând creșterea, pe când cele materne, inhibând creșterea.

Igf 2 este un factor de creștere cu specificitate fetală, pe când **IGF 2r** supresează activitatea acestuia.

Reglatori ai ciclului celular precum **Gnas**, **Gfr 1** și **p7 KIP2** sunt supuși imprinting-ului, creșterea fiind procesul fiziologic afectat de imprinting. Funcția genei **H19** este de supresie a transcripției **Igf 2** și **Ins-2.**

Gena **Snrpn** este amprentată atât la om, cât și la șoarece, și se pare că ea dirijează sinteza unui factor de splicing al ARN (Mc Allister și colab., 1988). O mutație țintită a acestei gene structurale nu are efect dăunător. În plus, pacienții cu sindrom Prader-Willi și Angelman nu au defecte de creștere. Mutațiile afectează în primul rând sistemul nervos central, determinând comportamente anormale și retardație mentală.

Există o ipoteză potrivit căreia imprinting-ul a fost elaborat în decursul evoluției, spre a preveni partenogeneza și homozigotizarea alelelor letale recesive. Acestea sunt consecințe ale imprinting-ului și ele pot explica ușor de ce sunt silențiate genele materne, dar nu pot explica de ce imprinting-ul este prezent la mamifere, dar nu este prezent la alte vertebrate, la care partenogeneza este în egală măsură dăunătoare. O altă ipoteză afirmă că imprinting-ul este un mecanism de supraveghere pentru apărarea împotriva aneuploidiei, sau că imprinting-ul a fost diferențiat, spre a proteja femelele de tumorile celulelor germinale ovariene, dar această ipoteză nu poate explica silențierea genelor paterne. După o altă părere, imprinting-ul este o extindere a genomului bacterian de apărare a celulei gazdă față de ADN străin. aceasta oferă o foarte probabilă explicație pentru metilarea genomurilor retrovirale în embrionii timpurii și metilarea cu specificitatea maternă a transgenelor la șoarece.

Numeroase gene imprintate (**U2 afbp-rs** și **Znf 127**)sunt retrotranspozoni lipsiți de introni ai genelor X-lincate. Deși imprinting-ul a putut fi cooptat în mașinăria biochimică a unui străvechi sistem de apărare a gazdei, nu se poate explica de ce organismul a utilizat o asemenea cale, spre a-și silenția propriile sale gene.

7. MODELE DE IMRINTING GENOMIC

Cele mai clare cazuri de **imprinting genomic** care pot fi analizate la nivel molecular s-au dovedit a fi unele tumori umane pediatrice. Asemenea boli constituie cazuri tipice de comportament previzibil de inactivare alelică, dependentă de originea parentală a gametului. Predicțiile implică originea parentală a alelelor supresoare de tumori, reținute în țesutul tumoral, din cazurile sporadice, și din analiza de linkage a predispoziției genetice, în cazurile ereditare. Ambele tipuri de date sunt previzibile dintr-o simplă reformulare a *modelului „celor două lovituri“*, propus de Knudson, pentru retinoblastoma (Knudson, 1971; Sapienza, 1990).

În modelul lui Knudson, tumorigeneza se presupune că este rezultatul inactivării succesive a ambelor alele ale unei gene supresoare de tumori, în cadrul uneia și aceleiași celule. În cazurile familiale, primul eveniment (prima lovitura) este moștenită, iar al doilea eveniment (a doua lovitură) apare în celula somatică, pe când în cazurile sporadice, ambele evenimente (lovituri) apar în una și aceeași celulă somatică. Dacă un locus supresor de tumori este supus inactivării prin **imprinting genomic**, modelul prezice că această inactivare va servi ca prim eveniment. Deoarece imprinting-ul este un proces dependent de originea gametului, evenimentul de inactivare ar trebui să apară fie numai în cromozomul matern, fie numai în cromozomul de origine paternă. În tumorile în care cel de al doilea eveniment este reprezentat de pierderea în întregime sau a unei părți a cromozomului care poartă alela funcțională supresoare a tumorii, originea parentală a alelei supresoare a tumorii reținută în tumoare va fi neîntâmplătoare (Sapienza, 1990).

Datele experimentale susțin fără dubiu reținerea preferențială a uneia dintre alelele parentale, în tumorile sporadice, precum cele de tumoare Wilms, osteosarcom, retinoblastoma și rhabdomiosarcom embrionar. Cromozomul reținut în asemenea cazuri, ca purtător al genei supresoare de tumori este, în covârșitoarea majoritate a cazurilor, de origine paternă. Există și modele alternative. Unul se bazează pe mai înalta rată de mutație, cu specificitate de locus, înregistrată în cursul spermatogenezei, față de ovogeneză (Dryja și colab., 1989; Leach și colab., 1990). Masculii produc gameți dintr-o populație de celule stem care se divid, mutațiile se pot acumula în aceste celule (ca o funcție de vârstă sau număr de diviziuni celulare), dând naștere la populații de spermatozoizi care poartă mutația. Mulți loci genici umani implicați în geneza bolilor ereditare acumulează mutații, pe o asemenea cale (Vogel și Motulsky, 1986). Frecvența cu care apar noi alele mutante în populația umană prezintă corelația pozitivă așteptată, legată de vârsta taților. Această trăsătură nu se înregistrează în cazul cancerelor pediatrice, dar ipoteza rămâne valabilă pentru restul cazurilor. În cel de al doilea model, toate mutațiile observate apar în linia germinală, dar acelea care derivă pe linie maternă nu se observă, deoarece ele nu supraviețuiesc. Aceste alele variante la locusul supresor de tumori se postulează a acționa ca letale, cu specificitate maternă (Sapienza, 1990). Acest model asumă că noile mutații acționează ca dominante în ovocite primare diploide, dar sunt recesive în celulele somatice care dau naștere la tumori. Aceasta se poate realiza prin invocarea unor cerințe specifice pentru *timing* adică momentul de expresie a genei supresoare a tumorii, în sensul că gena poate să nu fie exprimată până după diviziune meiotică.

Inactivarea unei alele prin IMPRINTING GENOMIC este, după toate probabilitățile, consecința acțiunii unei GENE MODIFICATOARE, care generează imprintul. Această concluzie se desprinde din constatarea apariției unui IMPRINTING DIFERENȚIAT, operațional pe loci genici din populații consangvine de **Drosophila melanogaster** (Spofford, 1976) și șoarece (Solter, 1988; Surani și colab., 1989), unde alelele în discuție sunt identice prin origine. În consecință, generarea imprintingului nu poate să reflecte în mod simplist diferențele în secvențele alelice (deoarece alela este aceeași, în fiecare caz), dar trebuie că reflectă un proces care depinde de originea gametului, implicând activitatea diferențiată a genelor modificatoare. Dacă aceasta este cazul, atunci trebuie că există două tipuri de cancere familiale. În prima clasă, alelele supresoare de tumori, care poartă alterări în secvența de nucleotide, vor fi moștenite ca mutații care predispun la cancer. În asemenea familii, boala va fi lincată genetic cu markeri în cromozomul care poartă alela supresoare de tumori. Sexul părintelui de la care este moștenită alela defectă nu are vreun efect predictibil. Astfel, efectul este exclusiv genetic, nu epigenetic, și, în acest caz, imprinting-ul nu joacă nici un rol. Acesta este cazul multor retinoblastoame familiale (Cavence și colab., 1985, 14986; Scheffer și colab., 1989), deși s-au făcut și afirmații contrare celor de mai sus (Munier și colab., 1992).

În a doua clasă de cancer familial, acționează o alelă supresoară de tumori, inactivată epigenetic, ca mutație ce predispune la cancer. Deoarece inactivarea acestei alele nu este dependentă de alela înseși, dar reflectă activitatea genei sau genelor responsabile de generarea imprinting-ului genomic, ereditatea fenotipului tumoral nu va fi legată de locusul supresor de tumori.

În cazul tumorii Wilms, în ciuda obținerii multor date citogenetice, de genetica celulei somatice și biochimie, privind localizarea în cromozomul 11p, a locusului genic supresor al tumorii Wilms, pedigree amănunțite au eșuat în a stabili vreo legătură dintre predispoziția la boală și markeri din cromozomul 11p. Considerând preponderența alelelor paterne în tumorile Wilms, aceste date aduc un sprijin puternic implicării fenomenului de imprinting genomic, în această boală ereditară.

Sunt date potrivit cărora un modificator controlat de genomul mamei este capabil să acționeze, în condiție trans, asupra unei alele supresoare de tumori, provenită de la tată. În acest caz, o relaxare a imprinting-ului poate reprezenta un mecanism mutațional epigenetic în carcinogeneză ca și în alte boli genetice.

Sunt multe raportări privind imprinting-ul genomic al locilor transgenici și endogenici, dar se cunosc puține aspecte referitoare la mecanismele moleculare. Letalitatea cauzată de deleția $\mathbf{T}^{hp}$, la locusul **Tme**, din cromozomul 17 de șoarece, moștenită pe linie maternă, este controlată de o singură genă nelincată. Dar, este posibil ca multe gene ce stau la baza imprinting-ului să existe și să acționeze în diferite situsuri în genom.

Gene care asigură, prin activitatea lor, imprinting-ul genomic, sau genele care controlează un asemenea proces, pot modifica expresia genică, fără a altera secvențele reglatoare în ADN. Acest proces poate fi cel mai ușor realizat de un reglator genic specific al transcrierii sau de un reglator mai general care influențează accesibilitatea genei afectate la factorii transcripționali, pe calea mediului structural al regiunii care înconjoară gena afectată. Mecanismul molecular al imprinting-ului în transgene se bazează pe metilarea ADN, având ca efect inactivarea transcripțională pe calea modificării epigenetice a structurii cromatinei (Hadchouel și colab., 1987; Reik și colab., 1987; Sapienza și colab., 1987; Swain și colab., 1987; Bird, 1986). Se admite că histonele, având conservatorism în tot cursul evoluției ar putea participa, pe o cale încă nedescifrată, în imprinting-ul genomic. Proteinele nonhistonice pot fi implicate în numeroase modificări reversibile, epigenetice ale cromatinei, cu rol în realizarea imprinting-ului genomic. Genele pentru proteinele nonhistonice pot fi, în consecință, considerate gene candidat pentru realizarea imprinting-ului genomic (Cartwright și colab., 1983; James și Elgin, 1986). La **Drosophila**, unele din aceste proteine sunt modificatori ai efectului de poziție, legat de variegare. Unele gene ale variegării la **Drosophila** au efecte de **imprinting genomic**. Variegarea, ca efect de poziție, apare ca rezultat al rearanjamentului cromozomal care juxtapune un segment eucromatic (ce conține gena de tip sălbatic) adiacent unei regiuni heterocromatice. Inactivarea transcripțională a genei și a genelor vecine are loc în anumite celule în care structura heterocromatinică se răspândește la nivelul unui locus de variegare (Eissenberg, 1989). Acest efect este polar, cu frecvența inactivării corelată cu proximitatea locusului față de joncțiunea heterocromatină-eurocromatină. Răspândirea heterocromatinei poate fi controlată de efectele aditive ale modificatorilor dominanți care promovează, ca niște veritabili amplificatori *(enhancers)* ai variegării, sau inhibă (supresori ai variegării) formarea heterocromatinei. Legea acțiunii masei este invocată în explicarea reglării răspândirii heterocromatinei în care echilibrul dintre formarea complexului modificator și disociația acestuia este determinat de concentrația relativă a subunităților proteinei modificatoare (Lyon și Raston, 1984).

Această corelație dintre imprinting și fenomenele care sunt reglate prin structura cromatinei a condus la elaborarea unui model mai specific pentru mecanismul real al imprinting-ului. Modificatorii variegării pe baza efectului de poziție la **Drosophila** răspund la doza de gene.

Procesul de imprinting poate implica un număr de produși genici ce acționează ca niște complexe de heterocromatinizare. Este posibil ca cel puțin una din genele imprinting-ului să fie localizată pe un cromozom de sex, datorită comportamentului dependent de originea gametului a acestui fenomen (Sapienza, 1990). Pe baza acțiunii legii maselor, este posibil ca imprinting-ul să fie reglat de cel puțin o genă modificatoare sensibilă la doză, localizată în cromozomul X. Efectul expresiei unei gene a imprinting-ului variază, depinzând de numărul de cromozomi X din organism. Unele regiuni ale cromozomului X de la mamifere nu sunt supuse inactivării X (Fisher și colab., 1990; Mondello și colab., 1988) și e posibil ca o genă a imprinting-ului să fie localizată într-una din aceste zone. Un modificator X-lincat, sensibil la doză, va condiționa o modificare sau un imprint (amprentă) dependent de originea gametului (Sapienza, 1990) (fig.3). Masculii vor fi deficienți pentru clasa 1 de modificatori, deoarece ei sunt hemizigoți pentru cromozomul X. Ca urmare, ei vor supresa variegarea locilor afectați la descendenții lor. Femelele vor avea o duplicație a cromozomului X și un modificator clasa I care va amplifica variegația la descendenții lor. Un modificator de clasa II, X-lincat, va avea un comportament reciproc celui al modificatorului de clasa 1. Variegarea unui locus amprentat va fi amplificată prin transmiterea masculă și supresată prin transmiterea femelă.

Proteina **HP1** este codificată de gena **Su (var) 205**, supresoare a variegării, prin efect de poziție și este un component structural al heterocromatinei, condiționând o regiune înalt conservată de 37 aminoacizi, la terminalul său amino, numit cromodomeniu. Același domeniu a fost identificat și la alte proteine, respectiv gene de la șoarece și om desemnate M31, M32, M33, HSM 1, prezentând omologie cu proteina **Polycomb** de la **Drosophila**, un membru al clasei de gene implicate în transmiterea clonală a stării represate a genelor reglatoare homeotice, în cursul dezvoltării. M31 și echivalentul său uman HSM 1 au 70% identitate cu HP 1, în regiunea cromodomeniului de 37 aminoacizi, M32 are 86% identitate cu M31 și Polycomb are 65% identitate cu HP 1, în regiunea cromodomeniului.

Omologia cromoboxului analizat prin Southern blotting arată că cromodomeniul are omologi atât la plante cât si la animale, ceea ce sugerează că represia genică este realizată prin mecanisme similare la plante și animale. Analiza mutațională a cromodomeniului Polycomb evidențiază că atât delețiile cât și mutațiile punctiforme abolesc capacitatea de legare la cromozomi (Messmer și colab., 1992). S-a sugerat că cromodomeniul poate fi esențial pentru proteine de împachetare în heterocromatină sau în complexe asemănătoare (Singh și colab., 1991). Cel puțin o genă omoloagă M31 a fost cartată în cromozomul X, la om și șoarece (Chevillard și colab., 1993; Hamvas și colab., 1992).

Și gena **Su var (3)7** este implicată în variegarea, ca efect de poziție (Reuter și colab., 1987, 1990). Analiza clonei cADN pentru această genă a evidențiat existența a cinci *zinc-finger* potențiale de tip Cys 2-His 2, fiecare *zinc-finger* fiind separat de 40-107 resturi de aminoacizi, aranjament unic, întâlnit, de asemenea, la produsul genei *trithorax*, de la **Drosophila**, fiind o proteină implicată în determinarea segmentelor corpului. Proteinele *zinc-finger*, reprezentând factori de transcriere, nu sunt organizate în maniera de mai sus. Asemenea spațiere a *finger*-ilor poate conferi produsului genic capacitatea de a se lega la situsuri relativ îndepărtate de pe ADN, pentru împachetare, spre a se realiza complexe de heterocromatină (Renter si colab., 1990).

Ambele aceste proteine îndeplinesc cerințele ca o genă amprentată să acționeze într-o manieră epigenică și reversibilă. Prin definiție, o genă amprentată trebuie să aibă un efect dependent de originea gametică. Cel puțin una din genele omoloage lui M31 a fost cartată pe cromozomul X, la om și la șoarece (Chevillard și colab., 1993; Hamvas și colab., 1992).

Imprinting-ul genomic a fost evidențiat la multe specii, atât la plante cât și la animale, ceea ce denotă înaltul conservatorism al fenomenului.

Imprinting-ul reflectă procesul de modificare a dominanței în care un fenotip determinat de o alelă poate fi variabil în diferite contexte genetice (Sapienza, 1989). Genele care reglează această variabilitate sunt modificatoare ale dominanței care, atunci când sunt localizate pe cromozomii de sex, prezintă proprietățile unice ale imprinting-ului, cu variabilitatea fenotipului alelic dependentă de originea gametului Această variabilitate alelică a expresiei este necesară pentru realizarea unei fecundații reușite. Între gameți dimorfici, imprinting-ul este menținut, deoarece descendenții rezultați din fuziuni gametice incorecte sunt fie neviabili, fie nefertili.

După altă ipoteză, imprinting-ul servește în reglarea controlului genetic al dezvoltării (Haig și Graham, 1991), ceea ce este dovedit de dezvoltarea androgenoților și ginogenoților în care ginogenoții dezvoltă în principal țesuturi embrionice, pe când androgenoții dezvoltă în principal țesuturi extraembrionice. Imprinting-ul opus al genelor **Igf 2 și lgf 2r**, vine ca o dovadă a existenței acestui fenomen epigenetic.

După datele actuale, menținerea amprentării în cursul embriogenezei, la nivelul celulelor somatice, este consecința metilării cu specificitate alelică a resturilor CpG, stabilită într-una dintre liniile germinale. Imprinting-ul genomic joacă un rol important în rata creșterii fetale. Regula este aceea că devine silențiată copia genică supusă amprentării, iar aceea care nu a suferit acest proces va fi activă în viitorul organism. Există și excepții de la o asemenea regulă.

Gene care sunt supuse imprinting-ului pot avea efecte pleiotropice, pot conferi avantaje selective, prin producerea de fenotipuri diferite și au putut coevolua cu alte componente selectiv avantajoase ale genomului. Din păcate, nu s-au identificat încă gene ale imprinting-ului genomic.

Este posibil ca mulți produși ai genelor ce fac obiectul imprinting-ului să acționeze concertant, probabil ca proteine cromozomale nonhistonice care interacționează spre a forma complexe proteinice ce influențează stabilizarea cromatinei.

CAPITOLUL XXVII

CÂTEVA MOMENTE REMARCABILE ÎN ISTORIA INACTIVĂRII CROMOZOMULUI X

1. INTRODUCERE

Deși descoperirea inactivării cromozomului X are o vechime de peste 30 de ani, mecanismele sale sunt, în cea mai mare parte, o enigmă. Descoperirea originală s-a realizat în timpul perioadei de rapidă înflorire a cunoașterii în domeniul eredității umane și a altor mamifere, consecință a expansiunii cercetărilor datorate preocupărilor legate de perioadele radiației atomice, de după cel de Al Doilea Război Mondial.

Povestea începe în anul 1953, când au fost descoperite primele gene X-lincate la șoarecele pestriț și marmorat, femelele heterozigote manifestând variegare. În anul 1959, s-au descoperit șoareci cu formula cromozomală X0, care erau femele viabile și fertile, ceea ce era un indiciu că numai un singur cromozom este necesar la această specie, pentru dezvoltarea unei femele normale.

În aceeași perioadă, Ohno a arătat că corpusculul cromatinei sexuale, descoperit cu zece ani în urmă, de către Barr și Bertram, reprezintă un cromozom X condensat. În acest moment, s-a descoperit o altă genă X-lincată care determină variegarea heterozigoților, ceea ce venea în sprijinul ipotezei că unul din cei doi cromozomi X a fost inactivat în celulele somatice ale mamiferelor. O idee identică a expus-o Beutler și colaboratorii (1969), prin care s-a explicat prezența la om a două tipuri de celule roșii, la femeile heterozigote pentru deficiența X-lincată a glucozei-6-fosfat dehidrogenazei.

Russel. (1961) a sugerat o explicație similară, dar mai puțin completă, pentru variegarea femelelor de șoarece care purtau translocații X-autozomi.

Studiul pisicilor "*calico*" (blană cu pete galbene-maronii) a permis vizualizarea fenotipică a inactivării randomizate a cromozomului X, purtător al genei pentru culoarea neagră (**b**$^+$) și a cromozomului X, purtător al genei pentru altă culoare (**b**).

Curând, ipoteza a fost modificată ca enunț, în sensul că nu un anume cromozom X a fost inactivat, ci mai curând un singur cromozom a rămas activ, considerând numărul de corpusculi Barr (cromatine sexuale) ce se văd la indivizi cu numere anormale de cromozomi de sex (XXX, XXY, XXXX). O problemă dificil de explicat a fost aceea că acești indivizi prezentau anomalii fenotipice care erau abia sesizabile la șoarece, dar severe la specia umană, la care fetițele X0 prezentau sindromul Turner.

S-a sugerat că ar putea fi o regiune neinactivată în cromozomul X care ar corespunde cu o regiune omoloagă din cromozomul Y și astfel nu ar necesita compensație de doză (Lyon, 1962).

O altă dezvoltare timpurie a teoriei s-a referit la celulele germinale. Ohno a constatat că ambii cromozomi X apar necondensați și, în consecință, activi, în celulele germinale ale femelei. Activitatea cromozomului X era o caracteristică doar a celulelor somatice (Lyon, 1970). S-a postulat că celulele germinale necesită dozaj al cromozomului X, diferit la cele două sexe, cu sterilitatea rezultând din moartea celulei germinale la aneuploizii pentru cromozomii de sex.

Un concept timpuriu al mecanismului de inactivare X a fost cel al existenței unui centru de inactivare a lui X, aflat în cromzomul X și de la care inactivarea se întinde în restul cromozomului. Această idee a fost generată de efectele văzute la femela de șoarece cu translocații X-autozomi. Inactivarea pare a se întinde de la X spre materialul autozomal atașat, dar numai spre unul din cele două segmente ale translocației. Mai mult, extinderea inactivării în materialul autozomal apare limitată în comparație cu aceea din X însuși. Spre a înțelege natura semnalului extinderii inactivării s-a apreciat că ar fi necesar să se găsească relațiile cauzale dintre proprietățile lui X inactiv: condensarea sa, replicarea târzie și absența transcripției (Lyon, 1966).

Astfel, ideea asupra inactivării lui X, în mare aceeași cu cea acceptată astăzi, era deja clară în anii 1960, și se poate pune întrebarea de ce progresul nu a fost mai rapid. O cauză este reprezentată de faptul că se cunoștea puțin despre genetica mamiferelor, incluzând omul și șoarecele. Nu exista la dispoziție o variație genetică corespunzătoare.

O piatră de hotar a venit odată cu enunțarea a ceea ce astăzi se numește **legea lui Ohno.**

Ohno (1967) a emis ideea că o dată cu teoria dozajului diferit în relațiile genelor autozomale și X-lincate, translocațiile care au apărut între X și autozomi, în cursul evoluției, ar fi dăunătoare și, în consecință, au fost eliminate. De aici, genele X-lincate la o anumită specie de mamifer vor fi lincate la toate speciile. Această ipoteză a deschis calea spre găsirea de gene X-lincate pentru studiul inactivării lui X, la orice specie și astfel a făcut posibil progresul în acest domeniu.

Legea lui Ohno este acum foarte bine dovedită, fără excepții, până în prezent, în cadrul mamiferelor euteriene. Totuși, au fost aduse date interesante, recente, referitoare la marsupiale și monotreme. Genele de pe brațul lung al cromozomului X, de la om (Xq), sunt X-lincate și la aceste grupuri, dar genele de pe brațul scurt a cromozomului X (Xp) sunt autozomale, atât la marsupiale cât și la monotreme, sugerând că aceste gene au fost recrutate din autozomi în cromozomul X, în cursul evoluției mamiferelor euteriene. Genele de pe cromozomii X de la om și șoarece au fost rearanjate unele în raport cu altele, în cursul evoluției și genele din Xp sunt găsite în cel puțin trei segmente separate ale cromozomului X, de la șoarece (Lyon, 1988). Probabil, aranjamentul de pe X uman este mai aproape de cel de pe cromozomul primitiv.

Prima surpriză a fost referitoare la alegerea lui X spre a fi inactivat: în contrast cu inactivarea randomizată, fie a lui X matern, fie a lui X patern, în diferitele celule ale mamiferelor euteriene, LA MARSUPIALE CROMOZOMUL X DE ORIGINE PATERNĂ ESTE CEL INACTIV, ÎN TOATE CELULELE (Cooper și colab., 1977).

Acesta este un exemplu de IMPRINTING CROMOZOMAL și a reprezentat probabil prima descoperire de acest fel la mamifere. Din punct de vedere al inactivității cromozomului X în celulele liniei germinale mascule, s-a sugerat că inactivarea lui X patern a reprezentat forma primitivă a fenomenului, de la care a evoluat inactivarea randomizată. Dovada pentru aceasta vine de la constatarea inactivării X-ului de origine paternă la mamiferele euteriene în celulele trofectodermei și ale endodermei extraembrionice de la embrionii de șobolan și șoarece ca și, destul de rar, în țesuturile extraembrionare umane.

2. ACTIVITATEA CROMOZOMULUI X ÎN CELULELE SOMATICE ȘI ÎN CELULELE GERMINALE

S-a emis ipoteza că stările de activitate diferite pentru cromozomul X în celulele germinale reflectă o necesitate pentru starea activă, eucromatică, pentru împerecherea normală din meioză. Prezența unor situsuri neîmperecheate este dăunătoare celulei germinale. Astfel, acolo unde sunt prezenți doi cromozomi X, într-o celulă germinală femelă, ambii trebuie să fie eucromatici, pentru o împerechere normală, pe când într-o celulă spermatogenică, în care unicul cromozom X nu are omologie cu Y, inactivarea lui protejează situsurile de împerechere de efectele dăunătoare. Asemenea inactivare a cromozomilor de sex din meioza masculă se întâlnește la alte grupe care au mecanismul cromozomal de determinare a sexelor XX: XY și el poate fi sistemul primitiv din care a derivat inactivarea X somatică. O altă posibilitate este că, pentru evoluția celulelor germinale mascule și femele, sunt cerute nivele diferite de produși genici X-lincați, orice nivel al acestor produși fiind toxic pentru o celulă germinală masculă, dar un nivel corespunzător la doi cromozomi X, este necesar pentru celulele germinale femele. Nu există nici o dovadă în sprijinul acestei idei, de vreme ce produși ai genelor X-lincate pot fi identificați în celulele germinale mascule normale. Totuși, rămânea să se dea o explicație morții celulelor germinale ale masculilor de sex reversat XX. La șoareci cu genotipul XX S_{XX}, toate celulele germinale mor în stadiul spermatogonial, pe când la șoarecele X0 S_{X0}, spermatogeneza continuă până în stadiul de spermatidă târzie. Excesul de produși genici X-lincați pare a fi o explicație posibilă.

3. INACTIVAREA X ȘI DETERMINAREA SEXELOR

O altă problemă se referă la faptul dacă inactivarea X ar putea fi implicată pe o cale oarecare în determinarea sexelor, prin determinarea unei diferențăe de dozaj la un locus critic cu un homolog pe Y. Chandra a sugerat că gena critică a fost una reglatoare, cu secvențe pe Y ca și pe X și astfel, ca rezultat al inactivării lui X, dobândește nivele diferite de produși genici la cele două sexe. Se favorizează ideea existenței de gene structurale cu gene omoloage sau aproape omoloage din X și din Y. Acum se știe că gena critică pentru determinarea sexului Y-lincată desemnată **Sry** nu are un omolog în X, de unde se poate deduce că aceste speculații nu sunt de interes. Totuși, cromozomul X este clar implicat până la anumit punct, în calea determinării sexului XY.

4. ANUL 1970 – PIATRĂ DE HOTAR ÎN DOMENIUL EMBRIOLOGIEI

Lyon (1971) a arătat că, în ceea ce privește mecanismul inactivării, inițierea și menținerea ulterioară a stării inactive trebuiesc considerate separat. Această idee a reprezentat o piatră de hotar în anii 1970, privind înțelegerea mecanismelor de inactivare a unui cromozm X la femeia mamiferelor.

Inițierea a fost un eveniment care a apărut într-un moment sau etapă specifice în embriogeneză și a implicat alegerea unui singur cromozom X pentru activitate și începutul inactivării celuilalt cromozom X. Aparent, aceasta a implicat un mecanism cantitativ de tip 2A:1X în care A este un set de autozomi, de vreme ce era dovedit că doi cromozomi X pot fi activi la triploizi (Webb și colab., 1992).

Menținerea inactivării lui X ar putea implica o oarecare formă de mecanism *feedback* în care starea activă a materialului genetic în cursul replicării să fi condus la o stare similară în cromozomii-fii. La mamiferele euteriene, stările de activitate sunt înalt stabile, după ce inițierea s-a realizat. La marsupiale, dimpotrivă, gene individuale pot deveni reactivate, fie în culturi de celule sau chiar în unele țesuturi, *in vivo*. Astfel, la un oarecare stadiu mai târziu, în evoluția conceptului de inactivare, ideea de stabilizare a fost adăugată celei de inițiere și menținere ca un factor suplimentar în procesul de inactivare X, stsabilizarea fiind slabă sau chiar absentă la marsupiale (Cartler și Riggs, 1983).

Este de interes în raport cu *imprinting*-ul că cromozomul X de proveniență paternă este aparent activ în embriogeneza timpurie; starea cromozomului X parental nu persistă pur și simplu la embrion. În plus, *imprinting*-ul în relație cu inactivarea X este oarecum diferit de cel din autozomi, prin aceea că starea cromozomului X, fie activă, fie inactivă, este aparent refixată de originea sa parentală. Dacă cromozomul X patern (X_p) este singurul prezent, precum la indivizii X_p0, el rămâne activ, și în embrionii partenogenetici X^mX^m, cromozomul X^m poate suferi inactivarea deși, probabil cu o frecvență redusă. Dovada din *imprinting*-ul autozomal este aceea că numai gene specifice suferă acest proces. Astfel, prin implicitul situației, în cromozomul X, locusul supus *imprinting*-ului este probabil a fi CENTRUL DE INACTIVARE și imprintul afectează probabilitatea acestuia de a primi semnalul care îl blochează.

Dezvoltarea metodelor de cultivare de celule embrionare, fie cu embriocarcinoame (EC) sau cu celule stem embrionare (ES) a condus la progrese suplimentare.

Diferite linii de celule EC cultivate au stări caracteristice de activitate a cromozomului X. Unele prezintă starea embrionară tipică, cu ambii cromozomi X activi, pe când în altele, inactivarea X a apărut deja, și se menține în cultură. Inactivarea X a fost realizată chiar în cultură, dacă celulele respective sunt lăsate să sufere diferențiere.

5. ANUL 1980 – PIATRĂ DE HOTAR ÎN DOMENIUL TEHNOLOGIEI ADN RECOMBINANT

Riggs (1975) ca și alți autori, au sugerat că metilarea ADN ar putea fi mecanismul de extindere a inactivării. Această idee a fost foarte tentantă, deoarece ea se potrivea cu toate condițiile impuse de proces. Potrivit ei, metilarea diferențiată a fost inserată la inițierea inactivării lui X, printr-o metilază de novo, care s-ar deplasa apoi de-a lungul cromozomului, ceea ce ar REPREZENTA UN

MECANISM DE REALIZARE CIS-LIMITAT AL INACTIVĂRII, ce ar afecta doar un singur cromozom X, nu însă și pe omologul său. Ulterior, în momentul replicării ADN, o metilază de menținere ar metila situsurile deja metilate pe jumătate. Astfel, rezultă că enzimele metilaze cunoscute ar putea genera diferențele necesare atât pentru inițierea cât și pentru menținerea inactivării.

Este acum clar că cromozomii X activi și inactivi arată într-adevăr diferențele caracteristice în pattern-urile de metilare. În particular, citozinele insulelor CpG din regiunile promotoare 5' ale genelor sunt puternic metilate în cromozomul X inactiv (Riggs, 1990).

Tratarea celulelor cultivate cu agentul demetilant 5-azacitidină conduce la reactivarea unor gene, și genele reactivate au metilare marcant redusă. Astfel, există dovada că metilarea diferențiată are un efect funcțional. Totuși, această aparență nu este implicată în procesul de extindere. Dovadă pentru această afirmație este faptul că metilarea diferențiată nu a fost remarcată în cazul genelor X-lincate de la marsupiale. În plus, ea aparent nu este prezentă în cromozomul X-inactiv din celulele endodermului extraembrionic de șoarece, de vreme ce ADN din această sursă poate transfecta liniile celulare negative HPRT și este astfel evident nemodificată. În ambele cazuri, al endodermului extraembrionic al marsupialelor și șoarecelui, cromozomul X suferă un tip preferențial de inactivare dacă este de origine paternă și, în plus, inactivarea este mai puțin stabilă decât tipul randomic de inactivare X.

Reversarea inactivării X poate apare în celulele cultivate de orice tip, și chiar in vivo la marsupiale, după cum deja s-a menționat. În prezent, metilarea este considerată ca parte a mecanismului de stabilizare a inactivării, după ce extinderea procesului s-a declanșat.

Lock și colaboratorii (1987) au constatat că metilarea diferențiată nu a apărut în embrionul de șoarece, după un timp oarecare de la inițierea activării și inducerea inactivării celulelor EC cultivate nu este imediat însoțită de metilare, (Barlett și colab., 1991).

6. GENE CARE SCAPĂ INACTIVĂRII

Studii de expresie genică au identificat mai multe gene din cromozomul X uman care nu sunt inactivate. Acestea sunt: STS, ZFX, UBEI (înainte AIS9), RPS4X și MIC2. Homologii unora dintre aceste gene din cromozomul X, de la șoarece, suferă inactivare normală (Ashworth și colab., 1991; Kay și colab., 1991). Astfel, această diferență în inactivare ar putea explica diferența dintre om și șoarece, în ceea ce privește fenotipul indivizilor X0. La om, aproape toate femeile X0 mor prenatal și puținele supraviețuitoare suferă de sindrom Turner, pe când la șoarece, femelele X0 sunt normale și fertile. S-a sugerat că această diferență se datorează prezenței genelor neinactivate din cromozomul X, care sunt necesare în doză dublă. O supriză este aceea că unele din genele umane neinactivate nu sunt localizate în segmentul de împerechere cu Y, unde s-a crezut inițial că s-ar putea afla genele necesare în doză dublă. Fără îndoială, unele au omologii apropiate în Y. Evident, această lucrare a încercat să explice diferențele în evoluția cromozomului X, la om și la șoarece. Indivizi X0 viabili au fost identificați la diferite specii de rozătoare, în unele cazuri ca tip normal, ca de exemplu la **Microtus oregoni**, sugerând că situația de la șoarece poate fi tipică rozătoarelor micromorfe. Puțin se cunoaște despre inactivarea X, la alte ordine de mamifere. Până în prezent, informații au venit de la specia umană, șoarece, marsupiale și monotreme.

De asemenea, gena AMELX de la om, care determină sinteza smalțului dentar se inactivează și are o alelă omologă pe cromozomul Y: AMELY. Gena AmelX de la șoarece nu scapă inactivării, iar cromozomul Y nu are o alelă omologă AmelY (Disteche, 1995). Rezultatul acestei situații este că la om, cele două sexe se deosebesc prin mărimea dinților (la sexul feminin acționeaza numai gena AMELX de pe un cromozom X, iar la bărbați acționează atât gena AMELX, cât și alela omologă AMELY). La șoarece, la ambele sexe, dinții au aceleași dimensiuni pentru că atât la masculi, cât și la femele acționează gena AmelX într-o singură doză.

S-a dovedit că inactivarea X se extinde mai puțin ușor în materialul autozomal, ceea ce i-a permis lui Riggs (1975) să postuleze existența unor "stații în drum", care ar promova extinderea procesului. În plus, ar putea exista răspunsuri individuale ale genelor la semnale, pe măsură ce acestea apar.

La **Drosophila**, produsul unei gene legate de compensația de doză se leagă la sute de situsuri de-a lungul cromozomului X (Kuroda și colab., 1991). Totuși, mecanismul compensației de doză la **Drosophila** diferă de acela de la mamifere prin aceea că aici nu există un centru de inactivare și segmentele cromozomului X se comportă autonom, atunci când sunt translocate în autozomi.

7. ANII 1990 - CLONAREA CENTRULUI DE INACTIVARE

În anul 1990 s-a reușit clonarea genei XIST, atât de proveniență umană, cât și de la șoarece, gena aceasta reprezentând un candidat pentru un rol în centrul de inactivare X.

Gena umană XIST se cartează în regiunea centrului de inactivare și este exprimată doar de cromozomul X inactiv. Ea a fost clonată de către Borsani și colaboratorii (1990) și de către Brockdorff și colaboratorii (1991).

Centrul de inactivare X, desemnat **Xic**, la om, a fost localizat Xq 13, adică în brațul lung proximal al cromozomului X. Dimensiunea regiunii este cuprinsă între 660 și 1200 Kb, fiind mult mai mică decât la șoarece. Regiunea conține cel puțin șase gene XIST/Xist, cuprinzând gena care codifică o proteină transportoare, transmembranară, desemnată XPCT/Xpct, gena BPX/Bpx, care este exprimată în mod specific în creier și care conține un domeniu care are o omologie extinsă cu genele care codifică pentru proteinele de asamblare a nucleosomilor, gena CDX4/Cdx4, omoloagă dar care nu este preferențial exprimată în creier și gena Tsx care se exprimă în mod specific în testicule.

Din combinarea localizării cu expresia sa, gena **Xist** apare ca un candidat puternic pentru un rol jucat în centrul de inactivare X. O surpriză este că Xist este exprimată în toate țesuturile adultului. Centrul de inactivare se postulează a fi implicat în inițierea inactivării X sau schimbarea stării de activitate a lui X. Asemenea schimbări au loc numai în momente specifice din embriogeneză, asociate cu diferențierea, și în stadii specifice din dezvoltarea celulelor germinale. Aceasta sugerează că gena sau genele care generează schimbările stării în aceste momente rămân să fie descoperite. La mascul, Xist este exprimată numai în celulele germinale, în care cromozomul X este inactiv, sugerând că inactivarea la femele, în celulele somatice, și la mascul, în celulele germinale, poate implica mecanisme similare.

Prezența cromozomilor X inelari este adesea asociată cu absența inactivării X, ceea ce conduce la doză anormală a genelor X lincate, aflate în cromozomul inelar, fenotip anormal și/sau retardație mentală. Majoritatea cromozomilor X inelari care nu suferă inactivare nu conțin nici regiunea **XIC**, nici **XIST**. În puține cazuri, totuși, gena **XIST** este prezentă în X inelar, dar nu este exprimată. Astfel, gena **XIST** singură nu este suficientă pentru inactivarea X și alte elemente cromozomale X care nu sunt conținute în cromozomul inelar sunt necesare. Nu se poate exclude nici posibilitatea ca structurile inelare să apară după debutul inactivării sau să fie refractare la inactivarea X.

Transcriptele **XIST**, atât la om cât și la șoarece sunt molecule mari (aproximativ 17 Kb) și sunt ubicvitar exprimate în țesuturile somatice ale femelei adulte.

Dovada directă a rolului lui **XIST** în procesul de inactivare a fost adusă prima dată de Penny și colaboratorii (1996). Ei au demonstrat că pentru realizarea inactivării este necesară gena **XIST** în **cis**.

În culturi celulare, celulele cu mutații (deleția a 7 Kb din exonul 1 și a unei părți din promotorul minimal al uneia din cele două alele **Xist**) nu realizează inactivarea X și sunt eliminate. Fenotipul șoarecelui *knockout* descris de către Marahrens și colaboratorii (1997) a confirmat cele afirmate mai sus. Dar, multe date pot fi interpretate în sensul că **XIST** nu este necesară spre a menține inactivarea X. Transcripția genei **Xist** nu este prin ea însăși importantă în inactivarea X.

Rolul **xist** ca ARN funcțional este însă dovedit de constatarea că ARN XIST rămâne în nucleu și chiar înconjoară corpusculul Barr heterocromatic. **XIST** ar putea constitui un element arhitectural, posibil un component al structurii nucleare necromatinice care se asociază specific cu teritoriul cromozomului X inactiv.

Dovada directă a rolului Xist în inactivarea X a fost recent adusă de Marahrens și colaboratorii (1997), la șoarecele ce poartă deleția **Xist**. Embrionii femeli care moștenesc alela **Xist** deletată din X patern (Xp) mor la scurt timp după implantare. Aceasta sugerează că gena **Xist** moștenită matern este incapabilă de a iniția inactivarea X, în linia celulară embrionară, spre deosebire de gena **Xist** moștenită de la tată.

Defectele manifestate de embrionii ce poartă alela **Xist** paternă, mutată - țesuturi extraembrionare slab dezvoltate – sunt similare celor întâlnite în partenogenoni și în embrionii cu cromozomi X materni, supranumerari. Asemenea constatări sunt în acord cu studiile mai timpurii asupra embrionilor cu disomie X maternă (XmXm) care conduc la noțiunea de rezistență imprintată a cromozomului X matern la inactivarea, în timpul dezvoltării timpurii.

Metilarea este un posibil mecanism de imprinting pentru **Xist**. Există multe date care sprijină afirmația despre rolul metilării în reglarea expresiei **Xist**, cu specificitate paternă.

Starea inactivă a lui X în cursul spermatogenezei a fost adusă în embrionul timpuriu, predispunând cromozomul X patern la inactivare X, în cele mai timpurii linii celulare citodiferențiale. Proteine specific testiculare și ale spermatogenezei se asociază cu corpul XY și histone precum TH 2A, TH 2B și H 1t sunt prezente în spermatocite, nu însă și în ovocite. În stadiile târzii ale spermatogenezei, majoritatea histonelor sunt înlocuite cu protamine. Cromozomul X patern care intră în complementul cromozomal al zigotului poate păstra asemenea modificări specifice cromatinei care ar putea influența expresia **Xist** imprintată în embrionul timpuriu și să determine supresia parțială a expresiei genelor X-lincate care se remarcă în embriogeneza timpurie.

8. SEMNALUL DE BLOCARE

Funcția exactă a centrului rămâne o enigmă. Un centru în fiecare celulă primește un semnal, care îl blochează, ceea ce face ca un cromozom X să rămână activ. Natura acelui semnal de blocare rămâne necunoscută. De-a lungul timpului s-a sugerat a fi un episom atașat la un situs specific în celulă, sau o "entitate informațională singulară" cu modelele recente implicând legarea cooperantă de molecula activatoare. Cum inactivarea X este considerată a implica echilibrul 2A:1X, acțiunea unei gene autozomale pe centrul de inactivare X este postulată în diferite teorii. La **Drosophila melanogaster** și **Caenorhabditis elegans**, la care raportul autozom – X este implicat în determinarea sexelor și compensația de doză, au fost identificate gene autozomale specifice implicate în proces (Hodgkin, 1987; Lucchesi și Manning, 1987) și este tentant să se facă speculația că mecanisme similare pot sta la baza determinării sexelor, în tot regnul animal. Totuși, la mamifere, nu s-au identificat deocamdată asemenea gene. Jacobs și Migeon (1989) au studiat replicarea cromozomului X în fetuși umani cu 18 trisomii autozomale din cele 22 posibile și nu au găsit anomalii. O lumină asupra rolului centrului în alegerea X-ului pentru inactivare poate veni din studiul elementului ce controlează X la șoarece, **Xce**. Acesta a fost descoperit, în anul 1960. Locusul **Xce** se cartează în regiunea centrului de inactivare, și există diferite alelele care afectează selecția lui X pentru inactivare (Johnston și Cattanach, 1981).

9. SEMNALUL DE ÎMPRĂȘTIERE (EXTINDERE)

Când a apărut blocajul unui centru, următoarea treaptă este inițierea semnalului de extindere (împrăștiere), probabil de către centrul de inițere.

Inactivarea X conduce la condensarea acestuia spre a forma cromatina sexuală care se replică târziu. La aceste evenimente caracteristice inactivării trebuiesc adăugate metilarea diferențiată și sensibilitatea diferențiată la DNază. Metilarea nu poate fi semnalul primar al extinderii, ci mai curând un factor ulterior, implicat în stabilizare. Starea fibrei de cromatină și timpul de replicare pot fi considerate ca elemente implicate în realizarea efectului primar.

Condensarea spre a forma cromatina sexuală apare mai târziu în embriogenie decât replicarea tardivă și, deci, apare improbabil a reprezenta efectul primar. Grant și Chapman (1988) și Riggs (1991) au subliniat faptul că replicarea tardivă ar putea oferi un sistem *feedback* de automenținere pentru păstrarea inactivării X, dacă replicarea tardivă blochează transcripția, iar absența transcripției conduce la întârzierea replicării. Riggs (1991) a propus că replicarea târzie și metilarea diferențiată sunt mecanisme de automenținere pentru stabilizarea inactivării. Marsupialele au doar replicare tardivă dintre aceste două mecanisme și de aici derivă și mai puțin stabila lor inactivare X. Euterienele au cele două mecanisme de stabilizare a inactivării X – metilarea și replicarea tardivă a cromatinei sexuale, de unde derivă stabilitatea la inactivare.

Pentru semnalul de extindere Riggs sugerează ca rol la acest semnal, un tip special de enzimă de restricție. Sugestia este că începând din centrul de inactivare, enzima s-ar înșuruba în ADN până ce întâlnește un element învecinat de la care activitatea ulterioară ar fi amplificată. Mersul ar putea fi în ambele direcții și ar fi cis-limitat, în acord cu cunoscutele proprietățile ale extinderii inactivării X. O asemenea înșurubare a enzimei în dublul helix ADN ar aduce împreună regiunile de atașare la scaffold-ul cromozomal (SAR) pentru buclele cromozomale. Un asemenea sistem ar aduce conformații ale cromozomilor X activi și inactivi și conformația ar putea fi reprodusă în timpul replicării. Acesta este un model foarte interesant, care explică cele mai multe dintre proprietățile de extindere a inactivării. O problemă este legată de rezultatele translocațiilor X-autozomi la șoarece, în care inactivarea se întinde în materialul autozomal atașat pe distanțe de până la mai multe benzi G și multe megabaze (Lyon, 1989). Astfel, semnalul trebuie să fie capabil să traverseze distanțe mari fără a avea nevoie de secvențe specifice din cromozomul X. Extinderea în materialul autozomal atașat a fost adesea comparată cu variegarea prin efect de poziție de la **Drosophila**, la care genele din eucromatină suferă inactivare când sunt translocate lângă heterocromatină, și acest efect se întinde pe distanțe considerabile. În acest caz, o proteină, heterocromatin – protein 1 (Hp-1) s-a constatat că este asociată cu efectul de variegare. Ar fi interesanrt de văzut care este rolul acesteia sau al unor proteine similare, de la mamifere. Modelul activării sau inactivării genelor prin buclarea ADN are, de asemenea, o altă relevanță. Elemente de graniță (delimitatoare), sau elemente de atașare la scaffold, de pe oricare parte a genelor le insulează de efectele supresive ale cromatinei înconjurătoare (Eisenberg și Elgin,1991). Este clar că aceasta este de relevanță pentru genele care scapă sau rezistă inactivării și pentru evidența că semnalul de extindere poate trece prin gene, dar le lasă încă active.

Aceste gene (elemente de delimitare similare care le insulează (Epstein și colab., 1978).

10. INACTIVAREA CROMOZOMULUI X

Mecanisme specifice de menținere, asigură ca aest cromozom X inactiv să fie transmis clonal, de-a lungul diviziunilor celulare succesive.

În cursul stadiilor celor mai timpurii ale embriogenezei femele, la mamiferele euteriene (placentare), incluzând specia umană, ambii cromozomi X, aduși de spermatozoid și de ovul, la nivelul zigotului, sunt activi. Replicarea asincronă a unuia dintre cei doi cromozomi X, în cursul ciclului celular, este unul dintre cele mai timpurii semne ale inactivării X și se observă doar la stadiul de blastocist, adică la 3,5 – 4,5 zile după împerechere, în celulele liniei trofectodermice. Studiile biochimice asupra genelor X-lincate precum G6PD, HPRT sau α-galactozidaza au adus dovezi suplimentare privitoare la prezența a doi, cromozomi X activi în embrionul foarte timpuriu.

Cuantificarea ARN cu specificitate alelică, utilizând tehnica extensiei nucleotidului primer (SNuPE) a permis măsurarea directă a nivelelor transcriptului.

Transcriptele derivate de la ambii cromozomi C, pentru genele Hprt și Pgk 1 au fost detectate în stadiul embrionar de 2 celule în blastocist (Heard și colab., 1997). Prezența a doi cromozomi activi X în stadiile foarte timpurii ale dezvoltării se crede că poate fi tolerată datorită numărului relativ mic de gene active X-lincate funcționale, în această fază a dezvoltării. Ulterior, în cursul dezvoltării, o absență a compensației de doză ar fi detrimentală, datorită transcrierii unui număr mare de gene, sau datorită genelor care sunt în mod particular sensibile la doză. La o linie de șoarece, la care un cromozom X nu poate fi inactivat, Tagaki și Abe (1990) au constatat că prezența în embrionii femeli a doi cromozomi X activi este letală, înainte de a zecea zi după împerechere.

Inactivarea X are loc într-o manieră reglată, în cursul dezvoltării, care pare a coincide cu diferențierea celulară.

La șoarece, inactivarea X nu este randomică în liniile cele mai timpurii care se diferențiază (trofectoderm și endodermul primitiv) care vor contribui la țesuturile extraembrionare și în care cromozomul X este preferențial inactivat.

Inactivarea X în celulele care dau naștere la embrionul propriu-zis are loc la un stadiu mai târziu de blastocist situat la 5,5 – 6,5 zile după împerechere, adică în momentul implantării placentare. Acum imprintul patern nu mai este operativ, cromozomii X de origine maternă și de origine paternă fiind inactivați randomizat, deși probabilitatea inactivării este afectată de locusul Xce. Inactivarea X este completă în toate celulele femelelor de șoarece, la începutul gastrulării, adică la 6 zile după împerechere.

Deși în celulele somatice femele starea inactivă a unuia din cei doi cromozomi X este stabilă și se transmite în tot cursul vieții individuale, în linia germinală, cromozomul X inactiv este reactivat la începutul meiozei, la aproximativ 12,5 – 13,5 zile, după împerechere. Reactivarea este cerută de necesitatea ca cromozomii omologi să fie în stare eucromatică, spre a se împerechea. Nu se cunoaște mecanismul molecular al reversiei inactivării X, reglată în cursul dezvoltării. Celulele germinale primordiale trebuie să fie localizate în vecinătatea crestei genitale pentru a avea loc în ele reactivarea cromozomului X inactivat, semnul local fiind esențial pentru realizarea acestui proces, fapt dovedit de absența reactivării în celulele primordiale germinale rămase în afara crestei genitale. Cromozomul X reactivat rămâne activ în ovocite, în cursul ovulației și fecundației, până ce are loc inactivarea în cursul dezvoltării evenimentelor de preimplantare.

În celulele germinale mascule, singurul cromozom X devine condensat și inactiv transcripțional, exact înainte sau chiar la debutul meiozei. Ele se replică tardiv în faza S și se asociază cu partenerul său de împerechere, cromozomul Y (care devine și el inactiv transcripțional, în acest stadiu) spre a forma vezicula sexuală, identificabilă citologic. Inactivarea unicului cromozom X, în cursul meiozei mascule poate preveni inițierea evenimentelor recombinaționale dăunătoare care ar putea apare ca rezultat al prezenței situsurilor neîmperecheate din acest cromozom. S-a crezut că cromozomul X rămâne inactiv în spermatocitele meiotice, în spermatidele postmeiotice și în spermatozoizi și că este reactivat în embrion, la scurt timp după fecundație. Date recente arată însă că un număr de gene X-lincate prezintă transcripție postmeiotică în spermatide, ceea ce denotă că inactivarea transcripțională a cromozomului X este într-adevăr restrânsă doar la perioada meiozei, așa cum este cazul cromzomului Y.

Studiul fracționării cromatinei, după încorporarea BrdU, în fibroblastele de femele, sugerează că locusul genetic NST se replică mai devreme în cromozomul X activ, față de cel inactiv. Mediul cromozomal și nu activitatea transcripțională pare că dictează programarea în timp a replicării genelor X-lincate.

Schimbările de ordin mai înalt în conformația cromozomului X sunt sugerate de observarea că acest cromozom X formează corpusculul Barr, localizat de obicei la periferia nucleului, de prezența unei plieri în brațul lung, proximal, al cromozomului X inactiv la specia umană, în Metafază, și printr-o posibilă structură buclată în interfază.

În celulele amniotice umane s-au evidențiat diferențe topologice ale suprafeței cromozomului X inactivat, comparativ cu cel activ.

CAPITOLUL XXVIII

RECOMBINAREA GENETICĂ

1. GENERALITĂȚI

Importanța recombinării genetice este discutată în general în contextul evidențierii avantajelor reproducerii sexuate comparativ cu reproducerea asexuată. Segregarea independentă a perechilor de cromozomi precedată de recombinarea genetică intracromozomală (crossing-over) permite o mai bună asortare a genelor. Drept consecință, are loc producerea și menținerea diversității genetice și în particular obținerea unor combinații alelice care se pot dovedi avantajoase în anumite condiții ale mediului înconjurător. Prin recombinare genetică crește probabilitatea ca mutații favorabile la nivelul diferiților loci să se regăsească în același genom, dar în același timp este favorizată înlăturarea mutațiilor nedorite din populațiile de dimensiuni mici. Fenomene recombinaționale au fost evidențiate în toată lumea vie, inclusiv la virusuri.

Recombinarea genetică în lumea vie îmbracă forme foarte variate, toate având ca suport materialul genetic (acidul deoxiribonucleic), acompaniat de un întreg echipament enzimatic. Multe aspecte intime legate de mecanismele recombinării sunt încă neelucidate, la ora actuală depunându-se eforturi considerabile în această direcție.

2. RECOMBINAREA GENETICĂ LA VIRUSURI.

La virusuri recombinarea genetică a fost evidențiată de multă vreme, existența ei determinând încadrarea virusurilor în categoria sistemelor care prezintă „sexualitate“, deoarece recombinarea genetică implică în primul rând sinapsa cromozomală, respectiv a macromoleculelor omoloage de ADN.

La ribovirusurile animale, de exemplu la virusul gripal (influenza), fenomenul recombinării are loc între cele opt segmente ale genomului viral ARN, aparținând la două tulpini diferite ce infectează aceeași celula gazda. Rezultă particule virale recombinate în care o parte din segmentele de ARN provin de la o tulpină, iar altele de la o altă tulpină. Din aceasta cauză, apar în fiecare an noi tulpini de virus gripal, diferite de cele din anul precedent. Recombinarea genetică s-a evidențiat și la virusul poliomielitei, atunci când două tulpini diferite ale acestuia au fost incubate simultan în același embrionat. Nu este exclus ca fenomenul recombinării genetice să aibă loc și între cele două molecule genomice de ARN viral ale virusului SIDA (HIV-1) care se pot diferenția prin acumulare de mutații diferite.

Recombinarea genetică la fagii T par (T_2, T_4, T_6) a fost detectată autoradiografic, ultracentrifugal și prin microscopie electronică.

Recombinarea genetică la virusuri implică trei etape:

-fragmentarea de către o endonuclează a catenelor de ADN parental care se vor recombina;

-realizarea unei structuri concatemere;

-tăierea structurii concatemere în segmente de lungime corespunzătoare genomului viral spre a fi incluse în virionii progeni.

La fagul T_4, recombinarea între ADN ce provine de la două tulpini diferite ce infectează aceeași celula bacteriana (infecție mixtă) se realizează astfel: cele două molecule parentale vin în intimă vecinătate, are loc o recunoaștere la anumite intervale de circa câteva mii de nucleotide lungime, anumite secvențe de baze manifestând o tendința expresă de interacțiune; după ce aceste secvențe se recunosc, intervin endonucleazele care efectuează crestături monocatenare, urmate de digestia monocatenei care lasă expuse segmentele monocatenei de ADN. Aceste segmente prezintă omologie de secvență și complementaritate de baze, ceea ce permite împerecherea segmentelor monocatenare, rezultând o moleculă hibridă numită heteroduplex. Heteroduplexul prezintă în el goluri care vor fi reparate prin intervenția enzimelor celulei gazdă ADN polimeraza și ADN ligaza. Rezultă o moleculă recombinată de ADN, adică un genom fagic recombinat.

La fagul T_4, structurile heterozigote care au la baza redundanța terminala oferă posibilități mărite de recombinare genetică. Redundanța terminală rezultă în urma formării moleculelor concatemere de ADN fagic, ca urmare a particularităților de replicare a genomului fagic la care moleculele fiice rezultate din replicare se unesc cap la cap, într-un singur ADN fagic gigant, sub acțiunea ligazei fagice. În timpul asamblării particulei fagice, această moleculă intră în capsida unde este compactată prin deshidratare în raport de 1:15 față de volumul moleculei hidratate de ADN. Când capsida este umplută, intervine o endonuclează care taie structura concatemeră, spre a genera un alt capăt liber care va pătrunde într-o altă capsidă.

Dar, în prima capsidă a pătruns un segment de ADN a cărui lungime este mai mare decât aceea care corespunde unui genom fagic normal. Redundanta terminala apare astfel: ABCDEFGAB/ CDEFGABCD/EFGABCDEF/G..... în care literele semnifica secvența de baze din genomul fagic, iar liniile — situsurile de atac ale endonucleazei și delimitarea diferitelor molecule progene ce pătrund în diferite capside.

3. RECOMBINAREA GENETICĂ LA PROCARIOTE.

Transferul de informație genetică între microorganisme este un fenomen larg răspândit în natură. Abilitatea microorganismelor de a schimba informație genetică stă la baza biotehnologiilor moderne. Toate aceste procese de transfer de gene au la bază fenomene de recombinare genetică.

Genomul bacterian permite realizarea diferitelor forme de recombinare genetică ce implică atât cromozomul bacterian, cât și plasmidele: recombinarea omoloagă, recombinarea situs-specifică, recombinarea ilegitimă.

3.1 Recombinarea genetică omoloagă la bacterii are loc la nivelul cromozomului bacterian sau al plasmidelor și stă la baza fenomenelor de conjugare și transformare.

Recombinarea genetică omoloagă necesită secvențe nucleotidice extinse cu grad ridicat de omologie. La *Escherichia coli*, acest tip de recombinare este dependentă de proteinele Rec, în special de proteina RecA. Gene analoage cu [*recA*] se regăsesc la numeroase genuri de bacterii gram-pozitive și gram-negative, precum și la cianobacterii.

Recombinarea omoloagă este eficientă atunci când operează cu secvențe de ADN omoloage, dar s-a constatat că în cazul căilor dependente de proteina RecA, recombinarea are loc cu frecvență scăzută și între molecule cu omologie de numai 20pb sau chiar cu un anumit grad de heterogenitate. Deși recombinarea genetică între genuri este extrem de rară, în studiile experimentale este folosită pentru stabilirea gradului de omologie și deci de înrudire între diferite specii.

In ceea ce privește genele și enzimele implicate în recombinare la bacterii, cele mai multe date au fost obținute prin studiul diferitelor mutante. Ulterior, genele al căror produs influențează recombinarea au fost identificate prin izolare, cartare, caracterizare fenotipică a mutantelor și clonare. În prezent se cunosc cel puțin 30 de gene care afectează recombinarea omoloagă la *E. coli*, dintre acestea un loc important ocupându-l genele [*rec.*] (fig. 1)

Gena [*recA*] este gena de recombinare cel mai mult studiată și cel mai bine caracterizată. Produsul său este proteina RecA. Aceasta are o greutate moleculară

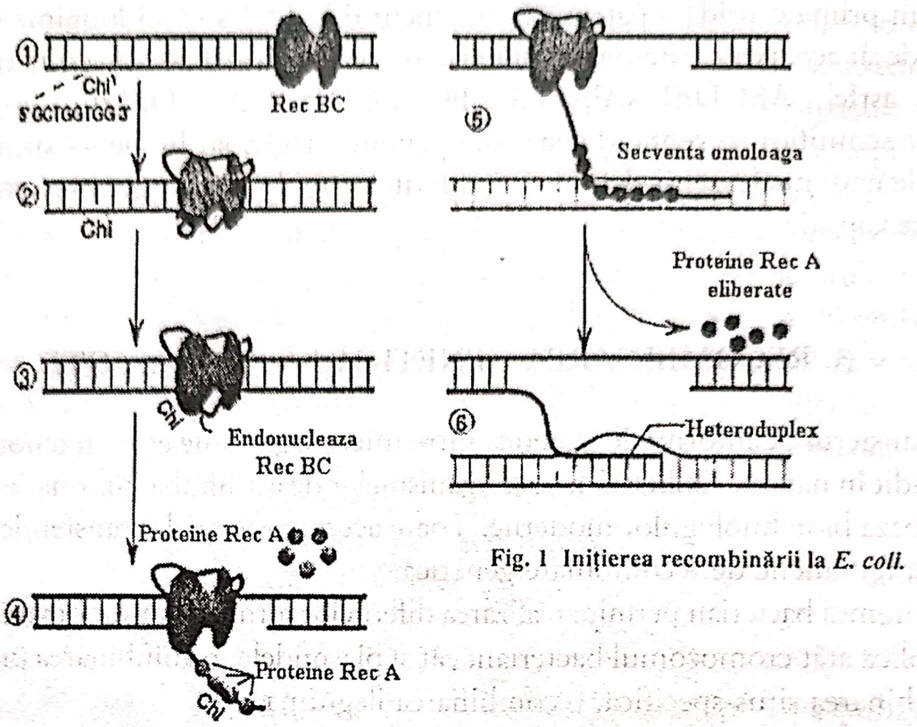

①
Chi
5'GCTGGTGG3'
Rec BC
②
Chi
③
Chi
Endonucleaza
Rec BC
Proteine Rec A
④
Proteine Rec A
Chi
⑤
Secventa omoloaga
Proteine Rec A
eliberate
⑥
Heteroduplex
Fig. 1 Inițierea recombinării la *E. coli.*

Fig. 1 — Inițierea recombinării la *E. coli.*

de 37,5 kD și îndeplinește deopotrivă un rol reglator direct și un rol indirect în recombinare. Proteina RecA are activitate ATP-azică dependentă de ADN, are afinitate mare pentru ADN monocatenar cu care formează filamente helicale nucleoproteinice care, la rândul lor, se leagă nespecific de ADN dublucatenar, generând rețele. Formarea acestor rețele permite alăturarea secvențelor omoloage, împerecherea și schimbul de material genetic, ulterior acesta fiind favorizat și de activitatea ATP-azică .

Proteinele Rec au funcții endo-/exonucleazice (RecC, respectiv RecB, RecD și RecE), unele fiind subunitati catalitice ale unor enzime complexe (RecBCD). Alte proteine care intervin în procesele de recombinare omoloagă sunt: proteinele SbcA, SbcB, SbcC, ADN polimeraza I, ADN ligaza, girazele GyrA și B, topoizomeraza I, helicaze, metilaze (Dam — ADN adenin metilaza, Dcm — ADN citozin metilaza) și o serie de exonucleaze.

Recombinarea genetică omoloagă la bacterii are loc la nivelul cromozomului bacterian sau al plasmidelor și este consecința fenomenelor de conjugare, transformare și transducție care asigură transferul de gene (segmente de ADN) dintr-o celulă donatoare într-o celulă receptoare. Acest transfer poate fi sau nu urmat de procesul de recombinare. (fig. 2).

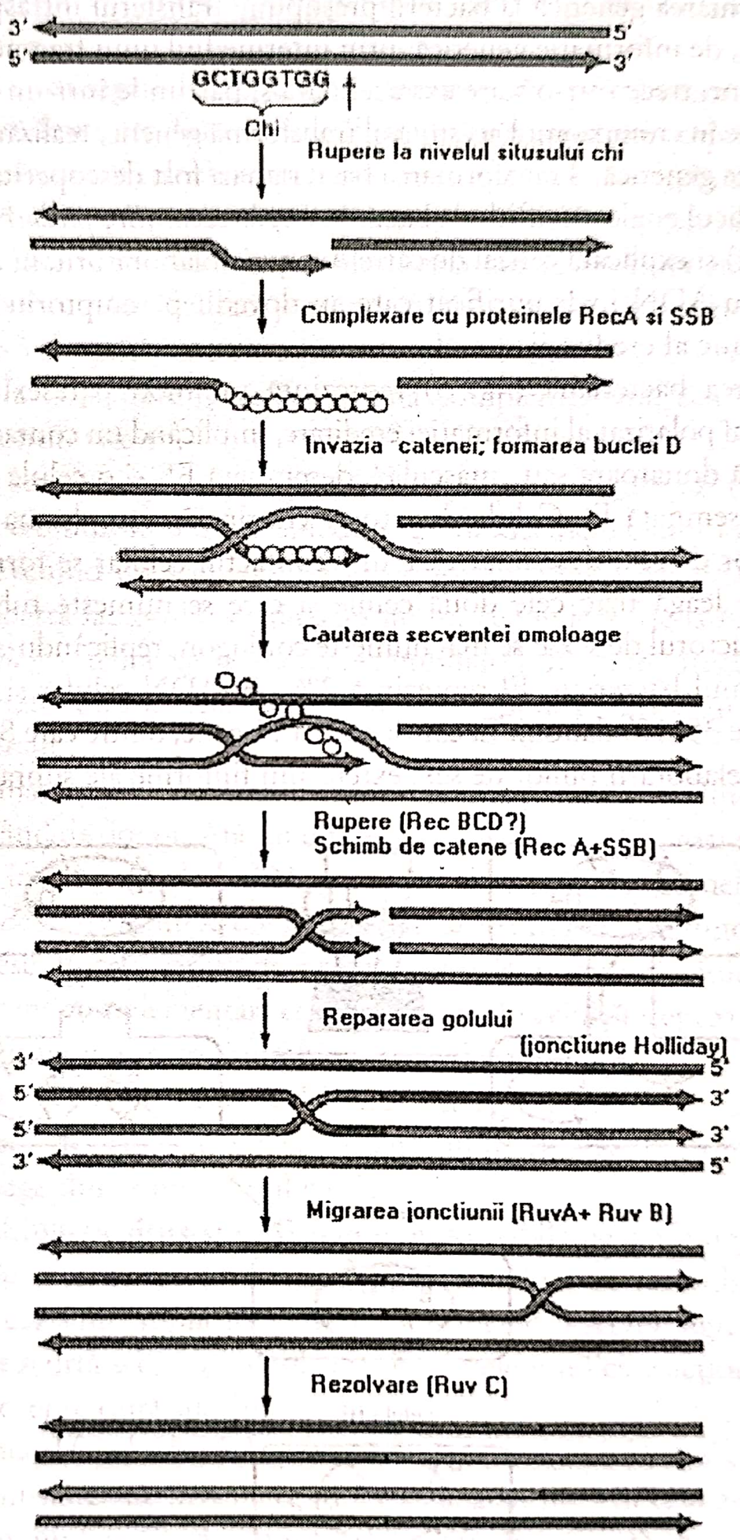

3'
5'
5'
3'
GCTGGTGG
Chi
Rupere la nivelul situsului chi
Complexare cu proteinele RecA și SSB
Invazia catenei; formarea buclei D
Cautarea secventei omoloage
Rupere (Rec BCD?)
Schimb de catene (Rec A+SSB)
Repararea golului
(joncțiune Holliday)
3'
5'
5'
3'
5'
3'
3'
5'
Migrarea joncțiunii (RuvA+ Ruv B)
Rezolvare (Ruv C)

Fig. 2 — Schema recombinării generale la *E. coli*.

Transformarea genetică la bacterii presupune transferul intraspecific, mai rar interspecific, de informație genetică, prin intermediul unui fragment de ADN ce iese din donor, trece într-o stare extracelulară și pătrunde într-un receptor unde, integrându-se în cromozomul acestuia, îl transformă genetic, realizându-se totodată recombinarea genetică. Transformarea bacteriana a fost descoperita în anul 1929, de către medicul englez Griffith, la bacteria *Diplococcus (Streptococcus) pneumoniae* (pneumococ) și explicată cauzal de către Avery și colaboratorii, în anul 1944 prin experiențe cu ADN înalt purificat care au dovedit peremptoriu rolul ADN ca substrat chimic al eredității.

Conjugarea bacteriană (fig. 3) reprezintă un mod parasexual de transfer unidirecțional polarizat al informației ereditare, implicând un contact celular direct între o celulă donatoare sau „masculă“, desemnată F^+, și o celulă receptoare sau „femelă“, desemnată F^-. Celula donatoare conține în citoplasma sa o plasmidă numită factor de sex, desemnat F. După contactul celular se formează o punte celulară care leagă fizic cele două celule și care se numește tub sau canal de conjugare. Factorul de sex F se mai numește conjugon, replicându-se independent de cromozomul bacterian. El reprezintă 2% din ADN celular și are o greutate moleculară de 35×10^6 daltoni. El conține circa 11 gene, dintre care 8 sunt implicate în controlul elaborării pililor de sex, extensiuni filiforme ale suprafeței celulare a

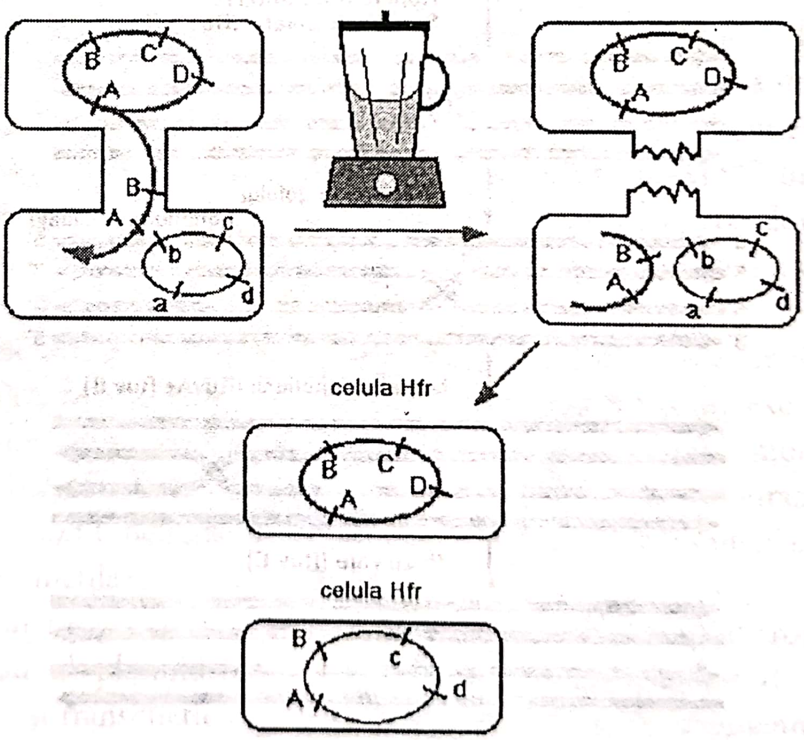


Fig. 3 — Conjugarea bacteriană.

celulelor F^+. Pilii de sex sunt receptori pentru bacteriofagi ARN masculi specifici cum sunt Qβ și R_{17}.

Prima etapă a conjugării bacteriene este formarea de „perechi sexuale“ specifice după ciocniri randomizate dintre celule F^+ și F^-. Transferul unei copii a factorului F din celula donatoare în celula receptoare se realizează printr-o replicare asimetrică a ADN plasmidial, după modelul inelului rotativ. În cadrul acestui model, după o prealabilă crestare monocatenară a moleculei circulare de ADN al factorului F, capătul 5' al monocatenei rezultate pătrunde în celula receptoare unde este copiată în direcția 5'–>3', rezultând o structură circulară bicatenară. Catena necrestată rămasă în celula donatoare își reface catena complementară, celula donatoare ramânând în continuare F^+.

Factorul de sex rămâne în stare liberă în citoplasmă. Foarte rar (1:10.000) el se integrează în cromozomul bacterian, după un model asemănător inserției ADN a fagului λ, devenind un segment liniar al cromozomului bacterian principal. Celulele care poartă factorul integrat s-au numit celule Hfr (de la *high frequency of recombination* — înaltă frecvență de recombinare). În stare integrată, factorul F pierde capacitatea de a se replica autonom și se supune controlului repliconului principal bacterian.

Transferul materialului genetic în conjugare este polarizat, ordinea precisă de transfer depinzând de donor. Atât în donor, cât și în celula receptoare, în procesul conjugării are loc sinteză de ADN. Aceasta sinteză poartă numele de *sinteză conjugațională de ADN*. Sinteza conjugațională se realizează prin funcțiile celulare care se deosebesc de cele cerute de sinteza normală a cromozomului bacterian. Sinteza unei catene complementare celei transferate în celula receptoare este cerută de necesitatea formării unei structuri bicatenare, deoarece în procesul recombinării genetice sunt implicate duplexuri de ADN. Altfel, catena transferată ar fi suficientă spre a realiza recombinarea genetică, purtând un marker genetic diferit de cel al regiunii omoloage din cromozomul gazdă.

3.2 Recombinarea situs-specifică este responsabilă pentru integrarea genomului fagilor în cromozomul bacterian. Spre deosebire de recombinarea omoloagă, în acest caz sunt implicate secvențe specifice din ADN fagic și bacterian care au o foarte scurtă secvență omoloagă. Enzimele implicate acționează numai asupra unor secvențe țintă specifice.

Ciclul de viață al fagului lambda presupune două faze: ciclul litic și ciclul lizogen. Pentru a intra în starea de lizogenie, ADN fagic aflat liber în celula trebuie să se integreze în genomul gazdă, devenind astfel o parte integrantă (profag) a cromozomului bacterian. Pe de altă parte, pentru a ieși din ciclul lizogenic și a intra în cel litic, genomul fagic trebuie să fie excizat din cromozomul bacterian.

Integrarea şi excizia se produc în urma proceselor de recombinare situs-specifică care se desfaşoară la nivelul aşa — numitelor **situsuri de ataşare (att).** In genomul de *E. coli*, asemenea situs este desemnat *attB* sau att^{λ}, în timp ce situsul fagic corespunzător este desemnat *attP*. Ambele tipuri au o structură asemănătoare, fiind alcătuite dintr-o porţiune centrală numită miez (O) şi din două braţe laterale (regiuni flancatoare), B, B' şi respectiv P, P'. Rezultatul recombinarii situs-specifice este integrarea ADN fagic în cromozomul bacterian, ADN care va fi flancat de doua situsuri noi, recombinate: BOP' (desemnat *attL*) şi POB' (desemnat *attR*) care vor fi implicate în excizie (fig. 4).

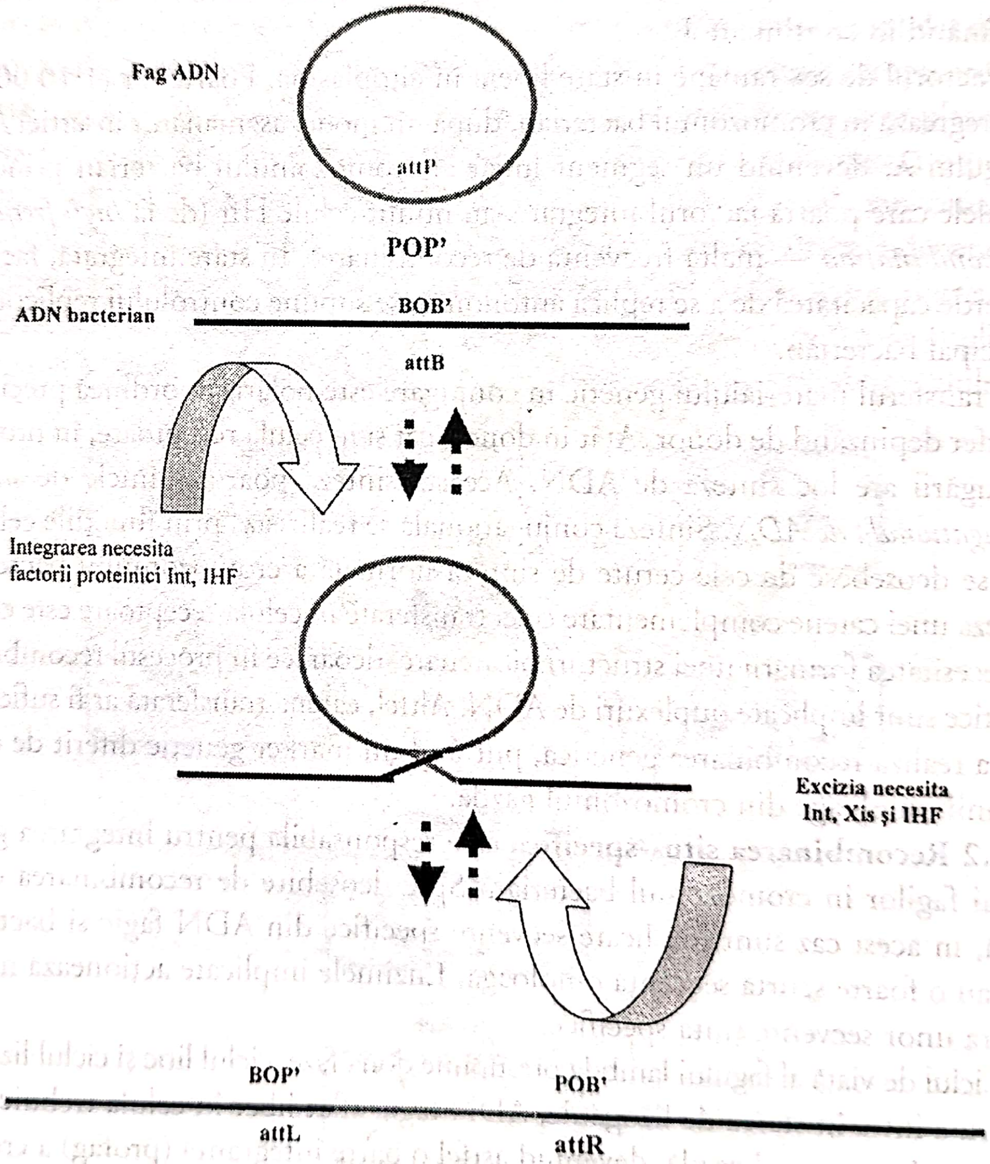

Fag ADN
attP
POP'
ADN bacterian
BOB'
attB
Integrarea necesita
factorii proteinici Int, IHF
Excizia necesita
Int, Xis şi IHF
BOP'
POB'
attL
attR

Fig. 4. Integrarea genomului fagului λ în genomul bacterian.

O consecință importantă a formării situsurilor *att* este faptul că integrarea și excizia nu implică aceeași pereche de secvențe. Procesul de integrare necesită recombinarea dintre regiunile *attP* si *attB*, în timp ce excizia se realizează prin recombinarea dintre *attL* si *attR*. Caracterul direcțional al recombinării situs-specifice este astfel controlat prin identitatea situsurilor recombinaționale.

Deși procesul de recombinare este reversibil, sunt necesare anumite condiții care să determine evoluția într-un sens sau în altul. Enzimele care intervin în cele două procese sunt diferite: integrarea se petrece sub acțiunea produsului genei fagice *int* și a proteinei bacteriene IHF (factor de integrare bacterian), în timp ce excizia necesită prezența în plus a produsului genei fagice *xis*. Se constată că proteinele Int și IHF sunt necesare în ambele cazuri. Proteina Xis joacă un rol important în determinarea evoluției ciclului de viață, acționând inhibitor asupra integrării, de fapt îndeplinind rol de excizionază.

IHF este o proteină cu masa moleculară de 20 kD, având două subunități diferite (heterodimer), codificate de genele bacteriene *himA* și *himD*. IHF nu este o proteină cu rol vital la *E. coli*, nefiind necesară în recombinarea omoloagă. Mutații ale genelor *him* impiedică integrarea fagului λ în genomul bacterian.

Mecanismul precis de recombinare nu se cunoaște. Studiile in vitro au evidențiat procese de tăiere urmate de apariția capetelor 3'-fosfat și 5'-OH și procese de ligare. Proteinele implicate au o mare afinitate față de situsurile *att*, afinitate care este sporită de superspiralizarea dublu-helixului ADN. Datele experimentale sugerează că proteinele nu au un rol catalitic, ci formează o structură suport pentru molecula de ADN implicată într-un eveniment de recombinare.

Proteina Int are mai multe domenii care recunosc secvențe consens ale diferitelor regiuni ale situsurilor *att*: domeniul N-terminal recunoaște brațele situsului *attP*, în timp ce domeniul C-terminal recunoaște miezul situsurilor *attP* și *attB* (fig.5).

↓
CAGCTTTT TTTATACTAAGTTG
GTCGAAAA AAATATGATTCAAC
↑

Fig. 5. Situsurile de recunoaștere ale proteinei Int.

IHF se leagă la o secvență de ~20pb în situsul *attP*. Proteina Xis se leagă la nivelul a două situsuri, totalizand 30-40pb din *attP*, astfel încât, practic, întregul situs *attP* este legat la cele trei proteine. Legarea proteinei Xis are drept consecință modificarea conformației ADN, astfel încât acesta devine un substrat inert (ineficient) pentru integrare.

Complexitatea recombinării situs-specifice se poate datora faptului că sunt necesare procese reglatorii care să inducă fie intrarea în starea de lizogenie, fie intrarea în starea de liză. Prin controlul exercitat asupra cantității de proteine Int și Xis va avea loc un eveniment sau altul (excizie sau integrare).

3.3 Recombinarea ilegitimă cuprinde toate tipurile de rearanjamente care afectează materialul genetic și nu se încadrează în recombinarea omoloagă sau situs-specifică, și anume procese de recombinare care apar la locul producerii unor deleții, inversii, duplicații.

Se pare că acest tip de recombinare se petrece mai ales în anumite situsuri din genom, numite și „puncte fierbinți" sau „pete fierbinți mutaționale". Au fost propuse două modele care să explice mecanismele recombinarii ilegitime (Franklin, 1971). Unul din aceste modele presupune o împerechere greșită a bazelor azotate care apare ca urmare a replicării incorecte și necorectate. Al doilea model se bazează pe tăiere și ligare a moleculelor de ADN. Ambele tipuri pot acționa simultan, rezultatul fiind modificarea informației genetice.

4. RECOMBINAREA GENETICĂ LA EUCARIOTE

Recombinarea genetică la eucariote se prezintă într- o mare varietate de procese.

Unul dintre aspectele recombinării la eucariote este recombinarea care are loc în meioză, moment din ontogenia organismelor cu reproducere sexuată când are loc împerecherea cromozomilor omologi, urmată de disjuncția lor spre polii opuși ai fusului de diviziune.

Recombinarea genetică intercromozomală este caracteristică doar eucariotelor, deoarece aceasta implică prezența mai multor perechi de cromozomi și totodată existența fusului de diviziune. La baza recombinării genetice intercromozomale stă orientarea randomizată față de polii fusului de diviziune a cromozomilor omologi din bivalenți, pe când aceștia se dispun la ecuatorul fusului in Metafaza I și care face ca pentru un anumit bivalent centromerul cromozomului de origine maternă să fie așezat deasupra planului ecuatorial al celulei aflată în Metafază, iar centromerul cromozomului de origine paternă să fie așezat sub planul ecuatorial al acesteia; pentru un alt bivalent, această așezare poate fi aceeași sau poate fi exact opusă. Așezarea strict determinată a centromerilor cromozomilor omologi ai unui bivalent, impune cu necesitate separarea omologului de origine maternă spre un pol și a celui de origine paternă spre polul opus. Dar, pentru ceilalți bivalenți, așezarea cromozomilor omologi față de planul ecuatorial este aleatoare, stohastică, față de aceea a unui bivalent dat. Datorită faptului că orientarea centromerilor cromozomilor de origine maternă și paternă din alți bivalenți față de planul ecuatorial al plăcii metafazice este aleatoare, la trecerea de la Metafază la Anafază are loc o disjuncție independentă a perechilor de factori ereditari de origine maternă și de origine paternă dispuși în aceste perechi de cromozomi, rezultând în gameți noi constelații de gene, unele gene fiind de origine maternă, pe când altele sunt de origine paternă.

Inainte de a se realiza recombinarea genetică intercromozomală are loc, tot în meioză, recombinarea genetică intracromozomală, realizată prin crossing-over. Recombinarea intracromozomala este un eveniment cheie în evoluția genomului. O populație evoluează prin recombinările omoloage care au loc în fiecare generație. Cromozomii recombinați au aceeași organizare ca și cromozomii parentali. Ei conțin aceeași loci genici în exact aceeași ordine, dar conțin combinații diferite de alele față de cele ale genitorilor, furnizând astfel material de lucru selecției naturale.

4.1 Recombinarea genetică omoloagă sau generalizată, numită și crossing-over, are loc la organismele eucariote în Profaza I a meiozei, atât la mascul (pe parcursul spermatogenezei, existând și unele excepții cum este cazul masculului de *Drosophila melanogaster*), cât și la femelă (în timpul ovogenezei). Frecvența recombinărilor diferă la cele două sexe, la femelă fiind de circa două ori mai mare. De asemenea, se manifestă o variație per genom și per cromozom, în vecinătatea regiunilor condensate și inactive ale cromatinei, crossing-overul fiind supresat.

Începutul meiozei este marcat de condensarea cromatinei în cromozomi individualizați. Cromozomii sunt reduplicați, fiind formați din câte două cromatide surori, fiecare la rândul ei fiind alcătuită dintr-un duplex ADN. În Profaza I a meiozei, cromozomii omologi se apropie unul de altul și încep să se împerecheze, formând bivalenți. Imperecherea continuă până când cei doi cromozomi omologi se suprapun pe întreaga lor lungime, procesul fiind cunoscut sub numele de *sinapsă cromozomală.*

Recombinarea genetică între cei doi cromozomi omologi ai bivalentului implică un schimb fizic de material genetic: oricare două cromatide nesurori dintr-un bivalent (tetrada cromatidială) suferă rupere urmată de reunire, cu schimb reciproc de segmente de cromatide, astfel că se refac cromozomii omologi în configurația anterioară schimbului, dar fiecare va avea într-una dintre cromatidele sale surori atât material genetic de origine maternă, cât și material genetic de origine paternă. Când cromozomii încep să se despartă, se pot observa puncte discrete în care ei rămân uniți — **chiasmele**, numărul și distribuția lor fiind corespunzătoare regiunilor în care a avut loc crossing-overul.

Mecanismul recombinării omoloage permite ca ADN bicatenar al unei cromatide surori a unui cromozom să interacționeze cu ADN bicatenar al uneia dintre cromatidele surori a cromozomului omolog. Schimbul de material genetic se realizează într-o manieră foarte specifică, cu precizie de nivelul unei perechi de baze. Au fost propuse mai multe ipoteze privind aspectele moleculare ale recombinării la eucariote. Un model larg acceptat este cel propus pentru prima dată de Robin Holliday, în anul 1964. Acesta admite următoarele: în timpul primelor stadii ale Profazei primei diviziuni meiotice, cromozomii omologi devin asociați punct cu punct (cromomeră la cromomeră) pe toată lungimea lor, dar interacțiunea la nivel molecular se realizează doar la nivelul unui număr limitat de segmente scurte, al căror număr și poziție variază de la o meioză la alta. La nivelul acestor segmente scurte, părți monocatenare de ADN echivalente cu părți de jumătate de cromatidă, devin separate (destabilizate, denaturate) de duplexurile lor parentale și sunt schimbate între cromatide omoloage și apoi reunite spre a forma un ADN dublu-catenar hibrid, cu catene de diferite origini parentale. Dacă regiunea hibridă include un situs de mutație, astfel că într-o moleculă se află o pereche normală de baze, iar în cealaltă, în poziție corespunzătoare, o pereche diferită de baze, adica mutantă, atunci la nivelul hibridului molecular va fi o pereche de baze greșit împerecheate sau necomplementare, care nu se încadrează în structura normală a ADN. Aceasta pare a fi baza conversiei genice, deoarece exista în celulă un mecanism care ar corecta această împerechere greșită prin scoaterea secvenței de nucleotide care cuprinde și un membru al perechii greșite și înlocuirea secvenței excizate cu o nouă secvență corect complementară. Aceasta ar face să aibă loc o conversie în ambele direcții, depinzând de faptul dacă membrul atacat de sistemul reparator este de tip mutant sau de tip normal. Absența corecției unei cromatide hibride determină o segregare postmeiotică în produsul meiotic corespunzător și conversia unei jumătăți de cromatidă în loc de conversia întregii cromatide.

Conform ipotezei lui Holliday crossing-overul presupune mai multe etape începând cu alinierea a două molecule de ADN omoloage (cei doi cromozomi bivalenți) (fig. 6). Urmează apariția unei rupturi în câte una din cele două cromatide surori a fiecărui cromozom omolog. Capetele libere care se formează se vor alătura catenelor omoloage ale cromozomului opus, pe bază de complementaritate, formându-se **joncțiunea Holliday** care se poate deplasa în ambele direcții, dând naștere regiunilor de **heteroduplex**. In aceste regiuni complementaritatea nu este, de obicei, totală. Procesul de deplasare a joncțiunii este cunoscut sub denumirea de „migrarea catenelor“și are semnificație atât din punct de vedere teoretic, cât si practic. Teoretic, conferă structurilor recombinaționale dinamicitate, iar practic, din cauza deplasării, nu poate fi precizat punctul de joncțiune în urma studiului moleculelor in vitro, deoarece există posibilitatea ca acesta să fi migrat față de momentul când a fost izolată molecula.

Prin procese ulterioare de tăiere și legare se vor forma două molecule de ADN care vor fi diferite ca structură de cele inițiale. Dacă tăierea are loc la nivelul cromatidelor care inițial nu au suferit rupere, se obțin heteroduplexuri recombinate, în schimb dacă tăierea se realizeaza pe aceleași cromatide care au suferit anterior ruperi, se vor obține heteroduplexuri care, fie vor fi corectate, prin repararea

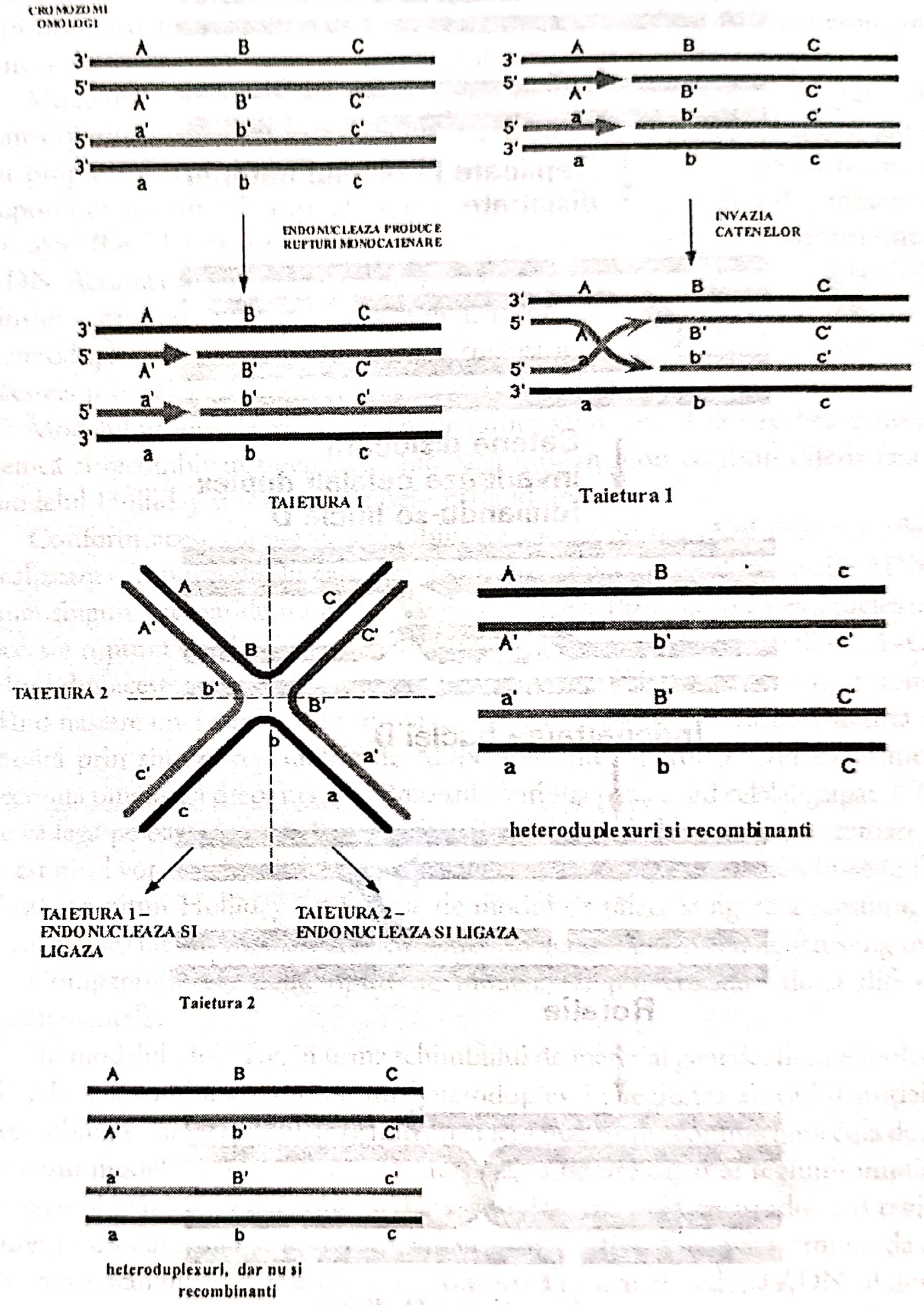

CROMOZOMI OMOLOGI
3' 5' 5' 3'
A B C
A' B' C'
a' b' c'
a b c
ENDONUCLEAZA PRODUCE RUPTURI MONOCATENARE
TAIETURA 1
INVAZIA CATENELOR
Taietura 1
TAIETURA 2
TAIETURA 1 – ENDONUCLEAZA SI LIGAZA
TAIETURA 2 – ENDONUCLEAZA SI LIGAZA
Taietura 2
heteroduplexuri si recombinanti
heteroduplexuri, dar nu si recombinanti

Fig. 6 — Crossing-over conform modelului Holliday.

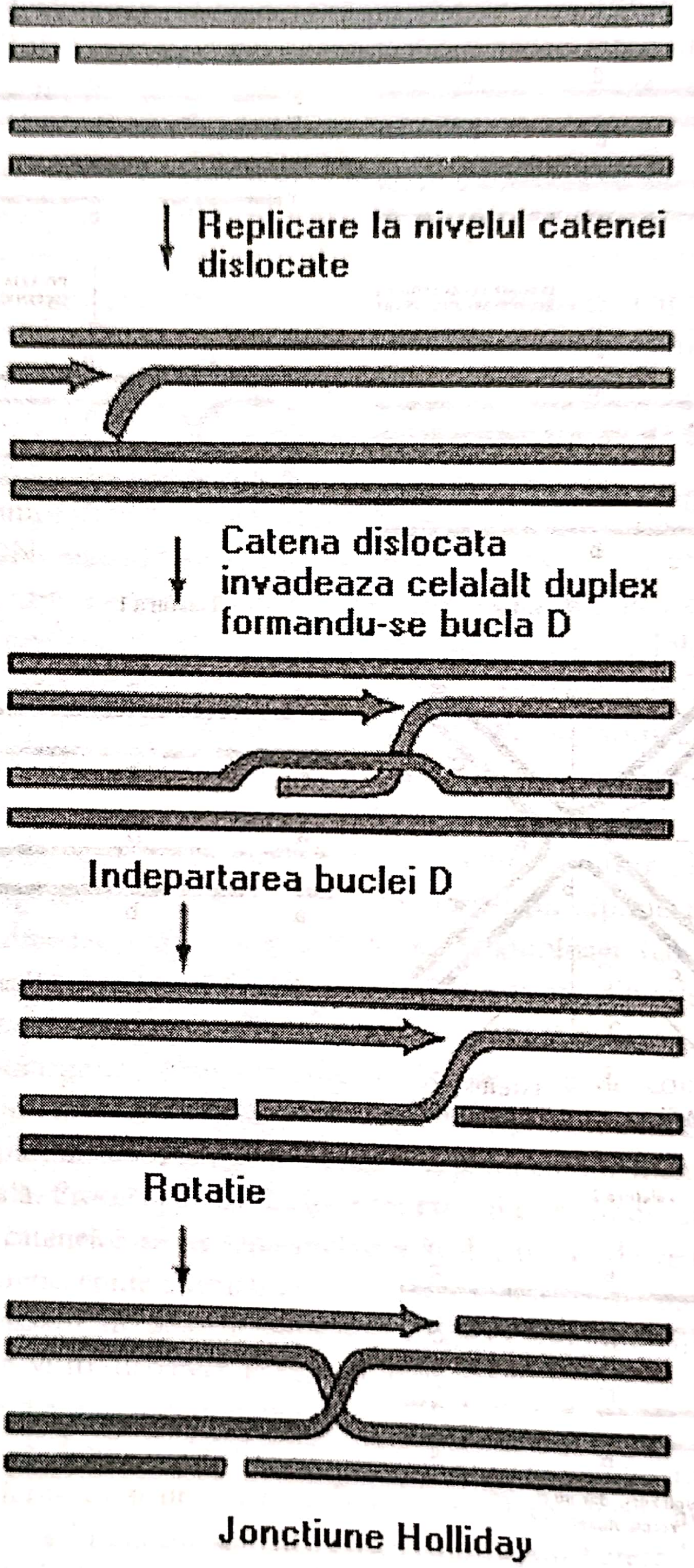

Replicare la nivelul catenei dislocate
Catena dislocata invadeaza celalalt duplex formandu-se bucla D
Indepartarea buclei D
Rotatie
Jonctiune Holliday

Fig. 7 — Modelul Meselson-Radding.

secvențelor necomplementare, fie vor conduce la conversie genică, dar în acest din urmă caz nu se vor obține recombinați (câte una din cele două cromatide surori ale fiecărui omolog va avea structura originală intactă).

Modelul Holliday a fost modificat și completat pe măsură ce au apărut noi date experimentale. Pe baza acestui model, Matthew Meselson și Charles Radding au propus un model conform căruia recombinarea poate începe cu o singură ruptură cromatidică la nivelul unui singur duplex din perechea de cromozomi omologi (fig. 7). Capătul 3'-OH care se formează va servi ca primer pentru sinteza ADN. Această catenă care a suferit rupere va invada cromozomul omolog la nivelul situsului care are omologie de secvență, formându-se *bucla D* și o regiune de heteroduplex. Procesul continuă cu formarea joncțiunii Holliday și rezolvarea acesteia prin tăiere și ligare la fel ca la modelul Holliday.

Modelul propus de Szostak și colaboratorii săi în anul 1983 explică conversia genică și recombinarea genetică omoloagă într-un mod cu totul diferit față de modelul Holliday și modelul Meselson-Radding.

Conform acestei ipoteze, recombinarea începe atunci când o endonuclează realizează o ruptură dublu catenară, la nivelul unuia dintre duplexurile ADN al unei singure cromatide numită „acceptor" (fig.8). Prin acțiunea exonucleazelor această ruptură este lărgită, apărând astfel un gol flancat de capete libere 3'-OH. Unul din aceste capete atacă nucleofilic duplexul ADN omolog (numit donor), dând naștere unei structuri în formă de *buclă D* (D-loop). Această structură este lărgită prin sinteză reparatorie de ADN, folosind capatul 3'-OH ca primer și secvența omoloagă drept matriță. Procesul continuă până când celălalt capăt 3'-OH se va lega pe bază de complementaritate la secvența de baze corespunzătoare. La acest nivel vor avea loc sinteze reparatoare, urmate de ligare, formându-se în final două joncțiuni Holliday. În funcție de modul de tăiere și ligare a acestora, pot rezulta molecule recombinate sau nerecombinate (crossing-over sau noncrossing-over).

Comparând cele două tipuri de modele, se pot constata două diferențe fundamentale:

-în modelul Holliday, în urma schimbului de material genetic, fiecare moleculă de ADN recombinat conține un heteroduplex în regiunea situsului inițial de recombinare, iar cromatida care inițiază atacul nucleofilic conține molecula donor; în cazul modelului rupturii dublu catenare, la fiecare capăt al regiunii implicate în recombinare se va găsi câte un heteroduplex, între ele regăsindu-se o regiune corespunzătoare golului care acum are secvența ADN-ului donor; cromatida care inițiază atacul nucleofilic este parțial convertită ca structură după ADN-ul donor.

-în modelul Holliday nu există nici un moment în care să se piardă informație genetică, în timp ce în cazul modelului Szostak, prin apariția rupturii dublu catenare, lărgită ulterior de exonucleaze, se poate pierde informație genetică. Celula

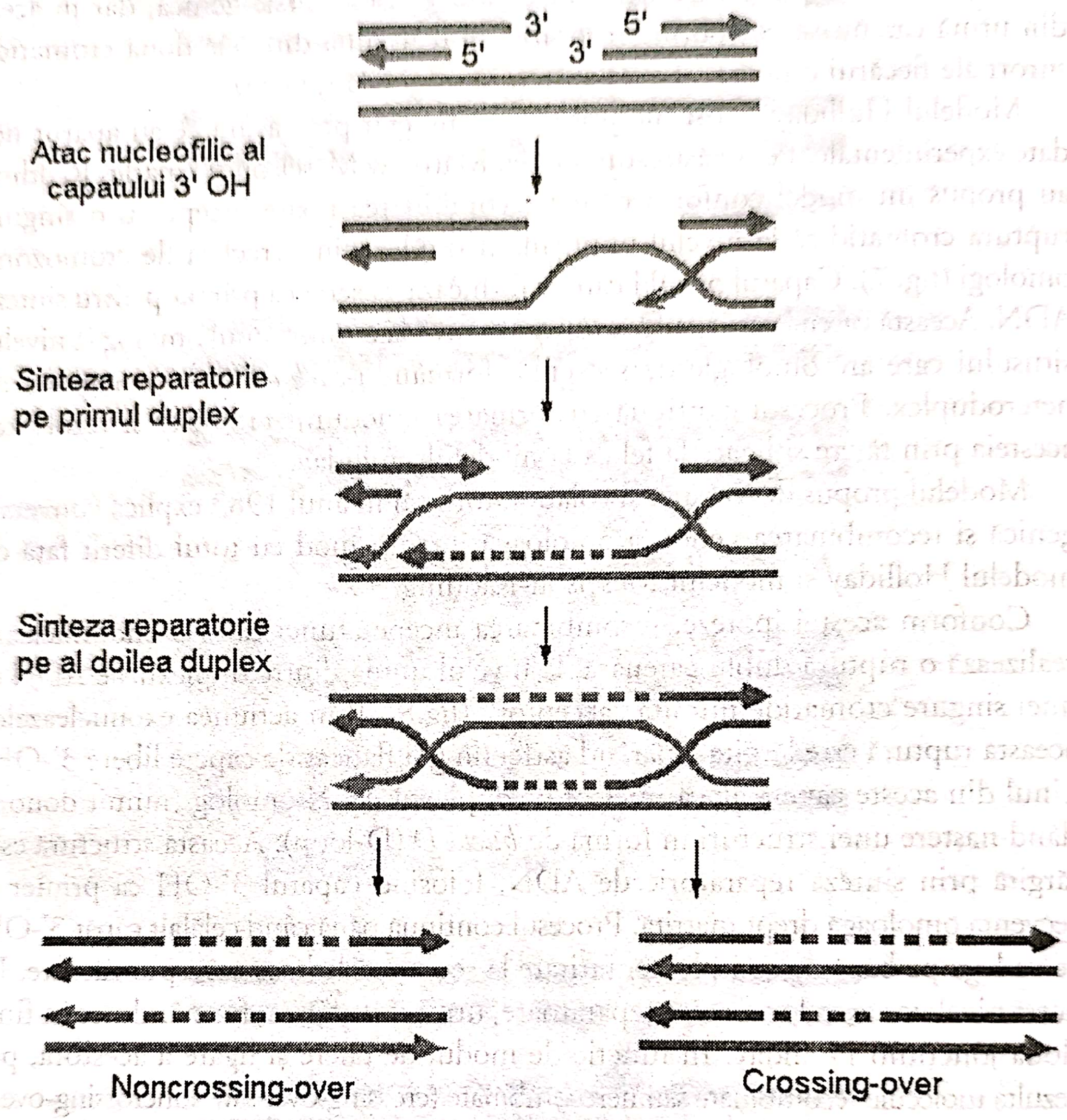

3'
5'
5'
3'
Atac nucleofilic al capatului 3' OH
Sinteza reparatorie pe primul duplex
Sinteza reparatorie pe al doilea duplex
Noncrossing-over
Crossing-over

Fig. 8 — Crossing-over conform modelului Szostak.

depășește însă acest inconvenient, resintetizând informația pierdută pe baza secvenței omoloage.

Ipoteza lui Szostak este susținută de date experimentale de ultimă oră, obținute în urma investigării meiozei la *Saccharomyces cerevisie*. Mutanții rad50 la care nu se pot forma capetele libere 3'-OH, sunt deficienți în recombinare. De asemenea, la acești mutanți, capetele 5' care se formează sunt legate de proteina Spo11 care are omologie de secvența cu una dintre subunitățile catalitice ale topoizomerazelor de tip II, ceea ce sugerează că rupturile dublu catenare ar putea fi efectul acțiunii unei topoizomeraze. Proteina Spo11 interacționează reversibil cu molecula de ADN,

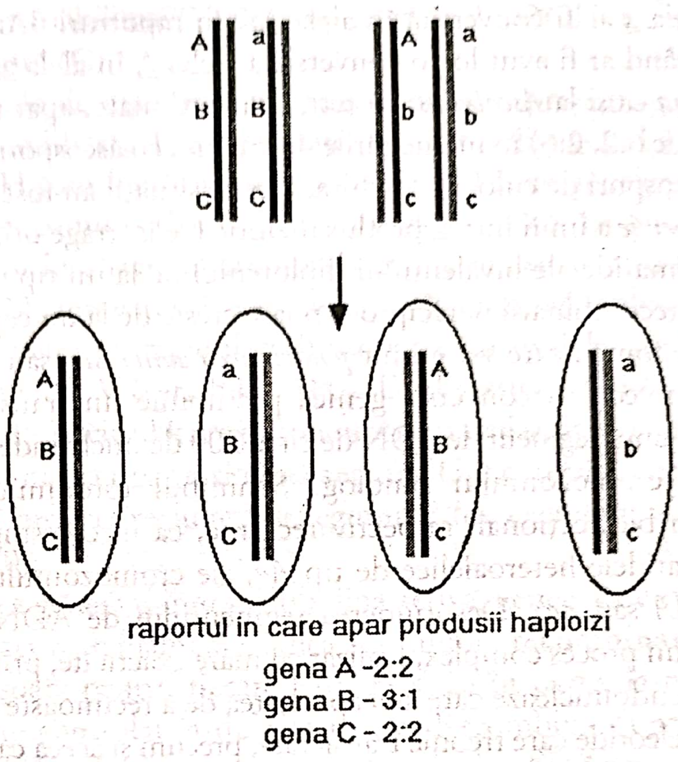


Fig. 9 — Conversia genică.

ruptura generată devenind stabilă prin intervenția unei alte proteine. Disocierea proteinei Spo11 de ADN este urmată de acțiunea exonucleazelor. S-a demonstrat că cel puțin alte nouă proteine intervin în formarea rupturii dublu catenare, ele constituind probabil o cale biochimică prin care în final se formează structuri recombinogene.

5. CONVERSIA GENICĂ

Este o recombinare genetică nereciprocă. Termenul de conversie genică a fost introdus de către Winkler, în anul 1930 și reluat de către Lindegren, în anul 1949. Conversia genică a fost evidențiată prin analiza tetradei la drojdii din genul *Saccharomyces*, unde uneori în 1 până la 10% dintre asce apare o abatere de la raportul normal de segregare alelică de 2A:2a, apărând raportul aberant de 3A:1a, 4A:0a, 1A:3a sau 0A:4a. La ascomicetele cu 8 ascospori în ască, apare o abatere de la raportul normal 1A:1a de segregare alelică (respectiv 4A:4a ascospori), evidențiindu-se raporturi aberante de segregare de tip 5A:3a; 6A:2a; 7A:1a; 8A:0a, ca și când alela a ar fi convertită în alela A, sau raporturi 3A:5a; 2A:6a; 1A:7a; 0A:8a, ca și când ar fi avut loc o conversie a alelei A în alela a (fig. 9).

La *Sordaria* ca și la *Ascobolus*, cu tetrade neordonate, apar raporturi aberante de segregare (de 6:2, 2:6) în încrucișările dintre sușa cu ascospori de culoare închisă și aceea cu ascospori de culoare deschisă. Aceste situații au fost interpretate drept cazuri de *conversie* a unui întreg produs meiotic (ce își trage originea într-una din cele patru cromatide ale bivalentului diplotenic) de la un tip de alelă la altul.

Frecvența recombinării nereciproce poate crește de la un capăt la altul al unui locus genic, fenomen care s-a numit *polarizarea conversiei* sau *polaron.*

La nivel molecular, conversia genică presupune un transfer unidirecțional (nereciproc) al unui segment de ADN de circa 200 de nucleotide, de la o cromatidă la cromatida cromozomului omolog. Schimbul este unidirecțional, adică nereciproc, nu bidirecțional, respectiv reciproc, ca în crossing-over. Prin acest schimb, cromatidele heteroalelice de tip *Aa*, ale cromozomului receptor, devin homoalelice(*AA* sau *aa*). Desprinderea segmentului de ADN ce urmează a fi transferat este un proces complex, realizat cu mare exactitate, prin intervenția unor enzime de tip endonucleaze care au capacitatea de a recunoaște cu mare fidelitate secvența de nucleotide care trebuie transferată, precum și aceea care trebuie excizată și hidrolizată, spre a fi înlocuită. Procesul este însoțit de repararea ADN.

Conversia și crossing-overul sunt fenomene asociate care apar în aceeași regiune. Cromatida care a suferit conversia este aproape întotdeauna aceeași care va participa și la crossing-over și viceversa. Este posibil ca recombinarea de tip nereciproc să aibă loc în imediata vecinătate a tuturor crossing-overelor.

6. RECOMBINAREA DE TIP V(D)J.

La mamifere, inclusiv la om, o componentă importantă a sistemului imun o reprezintă anticorpii (imunoglobulinele). Anticorpii sunt o clasă de proteine produși în exclusivitate de linia limfocitară B. Rolul lor este de a recunoaște și a interacționa cu moleculele antigenice, determinând apariția răspunsului imun. Pentru a face față diversității enorme a antigenilor, anticorpii trebuie să manifeste, la rândul lor, o mare variabilitate care este asigurată la nivel genetic.

O imunoglobulină tipică este alcătuită din două lanțuri polipeptidice identice grele (**H,** de la engl. *heavy*), cu masă moleculară mare, care sunt legate între ele prin punți disulfurice și două lanțuri polipeptidice usoare (**L,** de la engl. *light*), cu masă moleculară mică, legate de lanțurile grele, de asemenea, prin punți disulfurice. Fiecare lanț polipeptidic este alcătuit, la rândul lui, din domenii globulare, în număr diferit, în funcție de clasa din care face parte. Capătul NH_2- terminal manifestă o mare variabilitate (V), în timp ce capătul COOH- terminal reprezintă porțiunea constantă (C).

La toate speciile de mamifere investigate până în prezent, lanțurile imunoglobulinice sunt codificate de gene situate în trei loci distincți. La șoarece, genele pentru lanțurile H sunt localizate în cromozomul 12, iar genele pentru lanțurile L se află în cromozomii 6 (locusul k) și 16 (locusul λ). La om, genele pentru lanțurile grele sunt localizate în cromozomul 14, iar cele pentru lanțurile λ și k, în cromozomii 22, respectiv 2. Genele pentru imunoglobuline sunt alcătuite dintr-un număr mare de regiuni codificatoare. Locusul H are în structura sa urmatoarele segmente: V (variabil, ~ 100), D (diversitate, ~ 12), J (reunire, ~ 4) și C (constant, ~ 8). Locusul k are o structură ceva mai simplă, conține numeroase regiuni V, 5 regiuni J și doar o singură regiune C. Locusul λ cuprinde 4 regiuni C, fiecare având propria regiune J și regiuni V (de exemplu: V2-JC2-JC4-V1-JC3-JC1) (fig. 10).

Pentru a putea genera o imunoglobulină activă, genele care codifică lanțurile componente suferă rearanjamente, adica așa-numita **recombinareV(D)J**. Aceste procese se desfășoară pentru fiecare lanț (H și L) în parte, la nivelul locusului codificator și este controlat la diferite nivele. Recombinarea are loc în timpul maturării limfocitelor B, primele care suferă rearanjări fiind genele din locusul H.

Prima etapă constă din alăturarea unui segment D și a unui segment J (fig. 11). A doua etapă este realizată prin alăturarea regiunii V la regiunea DJ, formată anterior. La nivelul locusurilor k și λ, rearanjarea decurge în mod asemănător, astfel încât, în final, gena care va fi transcrisă în limfocitul B matur diferă de gena din care provine, adica a celulei stem, deoarece nu mai conține decât o parte din informația genetică inițială. Regiunile V, D, J care nu sunt selectate sunt excizate și îndepărtate sub formă de ADN circular. Gena formată prin recombinare neomoloagă va fi transcrisă cu toate segmentele C care, ulterior, vor fi excizate parțial prin splicing.

Segmentele V,D,J,C reprezintă regiuni codificatoare care vor fi transcrise în ARN mesager. Ele sunt flancate de secvențe semnal de recombinare (RSS), constând dintr-un heptamer parțial conservat și un nonamer, despărțiți printr-un spațiator de 12 sau 23 perechi de baze. Recombinarea eficientă se poate face doar între regiuni cu mărime diferită a spațiatorului (regula „12/23“). În urma unei rupturi dublu catenare între regiunea codificatoare și secvența semnal (RSS), se formează un capăt neted (capăt semnal) și o structură hairpin covalent închisă (capăt codificator). Capetele semnal sunt reunite într-o manieră precisă, în timp ce capetele codificatoare sunt procesate înainte de a fi reunite (prin deleție sau adiție de nucleotide), crescând astfel variabilitatea proteinei codificate și implicit a imunoglobulinei.

Singurele proteine specific limfoide cunoscute la ora actuală care inițiază recombinarea V(D)J sunt codificate de genele activatoare ale recombinării *rag1* și *rag2* și de terminal deoxinucleotid transferaza TdT. Studii efectuate recent, pe baza unui sistem de clivare in vitro, au demonstrat că regiunea nonamerică servește ca situs de legare al proteinei RAG1, în timp ce heptamerul are rol de orientare a clivării în urma căreia apare o ruptură dublucatenară.

După formarea capătului semnal, acesta va fi asociat cu un complex proteinic care are rolul de a impiedica acțiunea endonucleazelor, ceea ce explică de ce acest capăt nu suferă modificări. Din complexul proteinic fac parte proteinele: RAG1, RAG2, grupul proteinic de înaltă mobilitate (HMG-1) și componente ale protein-kinazei ADN dependentă (DNA-PK).

Spre deosebire de acestea, capetele codificatoare sunt reunite rapid, după rezolvarea structurii hairpin. In urma ruperii acestei structuri pot avea loc procese

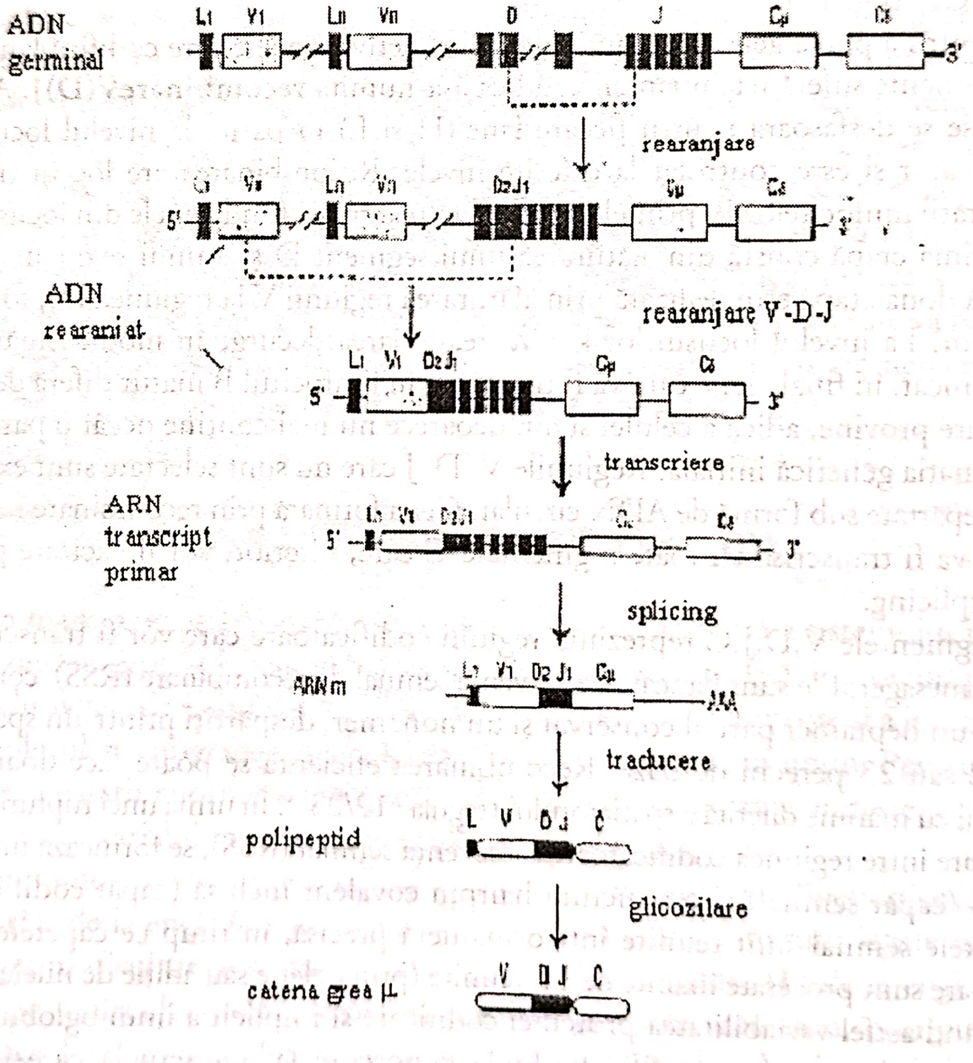

ADN germinal
L1
V1
Ln
Vn
D
J
Cμ
Cδ
3'
rearanjare
5'
L1
V1
Ln
Vn
D2J1
Cμ
Cδ
3'
ADN rearanjat
rearanjare V-D-J
5'
L1
V1
D2J1
Cμ
Cδ
3'
transcriere
ARN transcript primar
5'
L1
V1
D2J1
Cμ
Cδ
3'
splicing
ARNm
L1
V1
D2
J1
Cμ
AAA
traducere
polipeptid
L
V
DJ
C
glicozilare
catena grea μ
V
DJ
C

Fig. 11 — Rearanjarea genelor pentru lanțul greu (locusul H).

de adiție sau deleție de nucleotide numite „nucleotide P" sau, dacă este implicată enzima TdT, adiție de „nucleotide N".

În ciuda faptului că recombinarea V(D)J este un proces înalt specializat, apariția rupturilor dublu catenare pe parcursul recombinării regiunilor V, D, J, C atrage mașinăria enzimatică reparatorie care funcționează de obicei indiferent de cauza/agentul care a determinat formarea acestor rupturi. Componentele acestui sistem reparator sunt discutate în capitolul „Repararea ADN".

7. RECOMBINAREA NESPECIFICĂ SAU TRANSPOZIȚIONALĂ

Este procesul prin care un **element genetic mobil** este inserat într-un ADN țintă. Elementele mobile care transpozează via ADN se numesc **transpozoni,** cele care folosesc un intermediar ARN sunt numite **retrotranspozoni** (fig. 12).

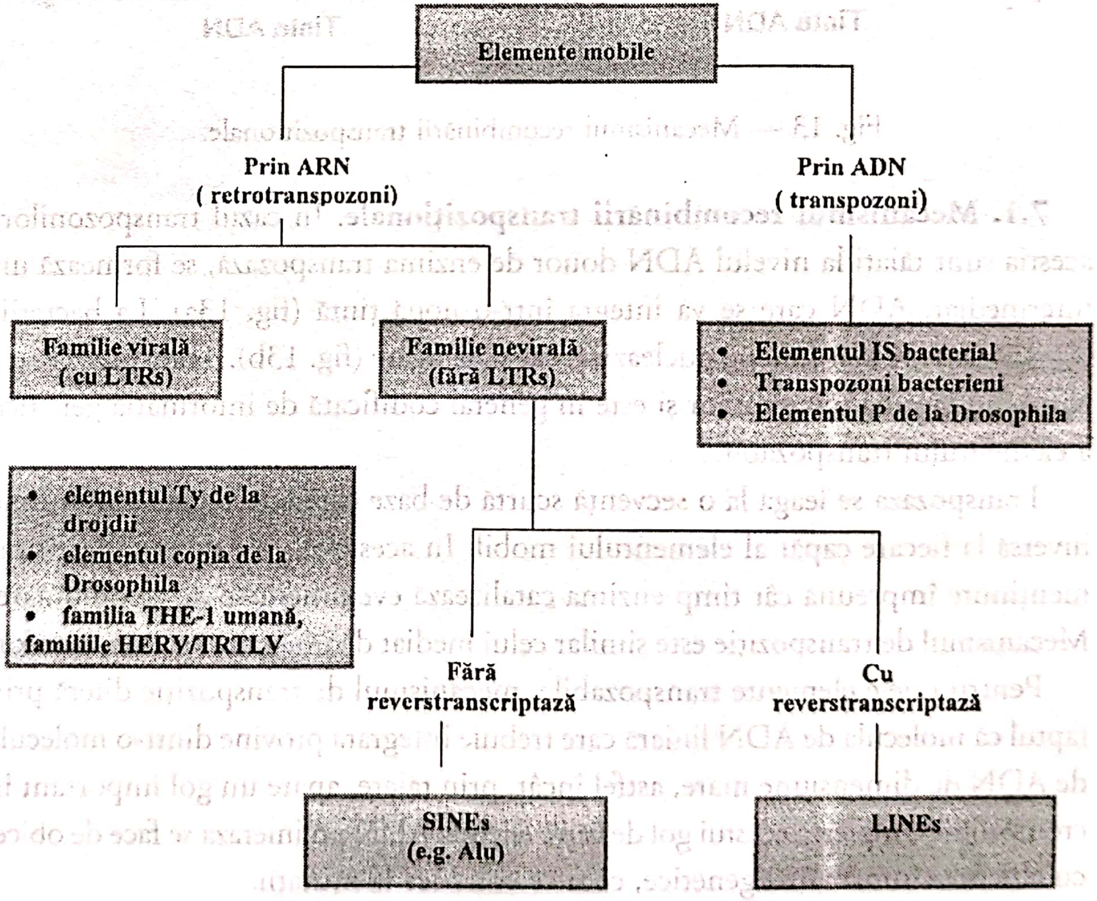

Elemente mobile
Prin ARN
(retrotranspozoni)
Prin ADN
(transpozoni)
Familie virală
(cu LTRs)
Familie nevirală
(fără LTRs)
• Elementul IS bacterial
• Transpozoni bacterieni
• Elementul P de la Drosophila
• elementul Ty de la drojdii
• elementul copia de la Drosophila
• familia THE-1 umană, familiile HERV/TRTLV
Fără
reverstranscriptază
Cu
reverstranscriptază
SINEs
(e.g. Alu)
LINEs

Fig. 12 — Tipuri de elemente mobile.

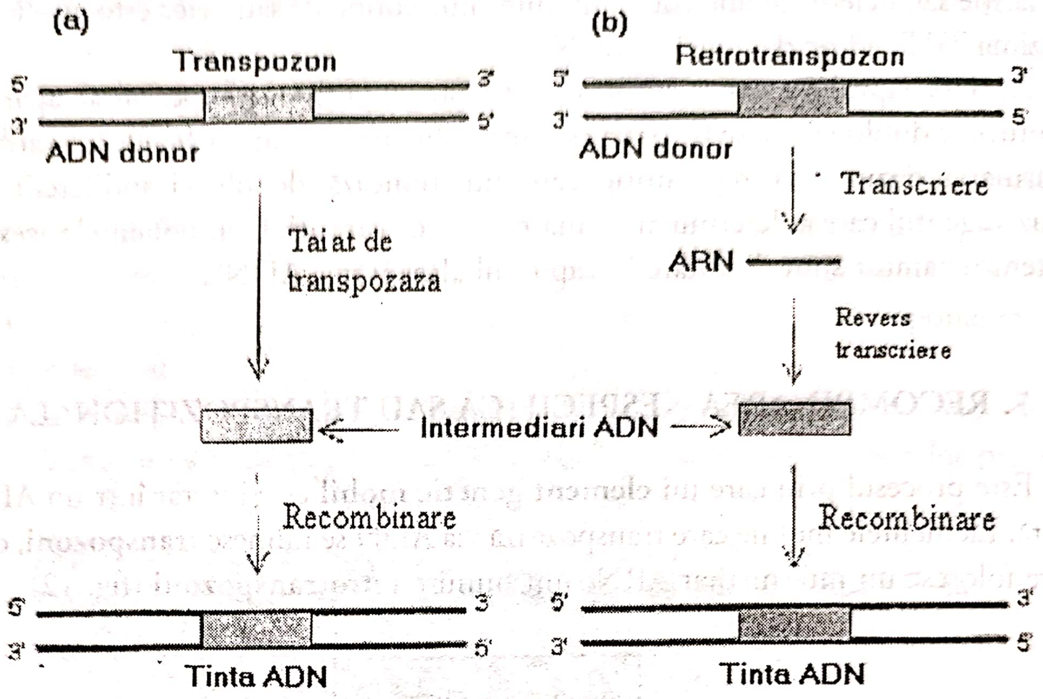

(a)
Transpozon
5'
3'
3'
5'
ADN donor
Taiat de transpozaza
(b)
Retrotranspozon
5'
3'
3'
5'
ADN donor
Transcriere
ARN
Revers transcriere
Intermediari ADN
Recombinare
Recombinare
5'
3'
3'
5'
Tinta ADN
5'
3'
3'
5'
Tinta ADN

Fig. 13 — Mecanismul recombinării transpoziționale.

7.1. Mecanismul recombinării transpoziționale. În cazul transpozonilor, aceștia sunt tăiați la nivelul ADN donor de enzima transpozază, se formează un intermediar. ADN care se va integra într-o nouă țintă (fig. 13a). La bacterii, transpozaza are atât funcție nucleazică, cât și de ligare (fig. 13b). Transpozaza face parte din familia integrazelor și este în general codificată de informația genetică a elementului transpozabil.

Transpozaza se leagă la o secvență scurtă de baze care este repetată în ordine inversă la fiecare capăt al elementului mobil. In acest fel, cele două capete sunt menținute împreună cât timp enzima catalizează evenimentele de recombinare. Mecanismul de transpoziție este similar celui mediat de integraza retrovirusurilor.

Pentru unele elemente transpozabile, mecanismul de transpoziție diferă prin faptul că molecula de ADN liniară care trebuie integrată provine dintr-o moleculă de ADN de dimensiune mare, astfel încât, prin tăiere, apare un gol important în cromozom. Umplerea acestui gol de către enzima ADN polimeraza se face de obicei cu alterarea informației genetice, ceea ce conduce la mutații.

Retrotranspozonii sunt elemente genetice mobile prezente în organisme foarte diverse: drojdii, nevertebrate, mamifere, etc.

Unul din cele mai bine studiate exemple este elementul Ty1 de la drojdii. Primul pas în procesul de transpoziție este transcrierea integrală a elementului transpozabil într-o copie ARN de peste 5000 nucleotide lungime. Acest transcript poartă mesajul genetic pentru o enzimă revers transcriptază care sintetizează o copie ADN dublu catenar, folosind ca matriță copia ARN via un hibrid intermediar ARN/ADN, mimând astfel etapele timpurii ale infecției retrovirale. În final, ADN dublu catenar format se integrează la nivelul unui situs aleator din cromozom, cu ajutorul unei integraze, modificând adesea expresia genei în cadrul căreia se inserționează.

Capitolul XXIX

ALTERAREA STRUCTURII GENOMULUI: MUTAȚIILE EREDITĂȚII

1. GENERALITĂȚI

Mutațiile sunt modificări incidentale, neprogramate, care apar în structura și funcția materialului genetic, nefiind consecința segregării sau recombinării genetice. Capacitatea mutagenă este capacitatea unui agent de a determina apariția de mutații. Mutabilitatea reprezintă capacitatea materialului genetic de a suferii mutații. Mutageneza este procesul de apariție a mutațiilor, sub acțiunea diferiților agenți mutageni. Mutantul sau mutanta reprezintă individul biologic purtător al unei mutații. Mutația reprezintă sursa primară a variabilității lumii vii, forță motrice a procesului evolutiv.

Noțiunea de mutație a fost introdusă de Hugo de Vries — unul dintre cei trei codescoperitori ai legilor mendeliene ale eredității. Prin studii efectuate la planta *Oenothera lamarckiana*, el a descoperit și descris fenotipul **gigas,** cu frunze foarte mari, apărut în urma procesului de segregare, desfășurat în această plantă care este un heterozigot permanent de translocație. Această separare de factori ereditari și combinarea probabilistică a genelor care erau ținute neexprimate în condiție heterozigotă — gene ce au condiționat fenotipul **gigas** — au fost interpretate de către Hugo de Vries ca reprezentând o modificare bruscă, adică **mutație,** considerând că aceasta reprezintă o specie nou apărută, pe care a denumit-o *Oenothera gigas.* Astăzi se știe că acest fenotip **gigas** este consecința heterozisului (fig. 1A), la această plantă existând un sistem genetic interesant, in care heterozigoția este permanentă, explicându-se astfel heterozisul acestei plante cu flori galbene și capacitatea ei concurențială excepțională, fiind actualmente răspândită în toată emisfera boreală. Când întâmplător se ajunge la o constituție genetică homozigotă, apar efecte nocive cel mai adesea cu letalitate zigotică (fig. 1B).

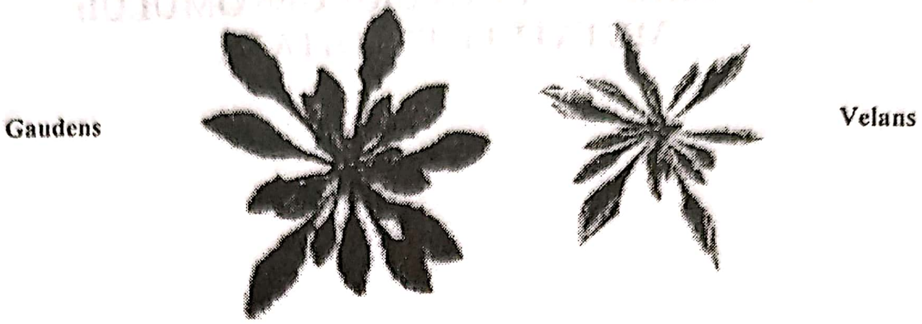


Fig. 1 — A Hibrizi gemeni de *Oenothera lamarckiana* (*) și *Oenothera hookeri* (&). *Oenothera lamarckiana* are constituția gaudens/velans. *Oenothera hookeri* nu are translocații. Descendența lor este asemănătoare aceleia unui testcross: 1 gaudens și 1 velans. *Gaudens* („fericit“, în limba latină) este un hibrid viguros și verde închis la culoare. *Velans* („amărât“) conține gene semidominante deletorii, are frunze înguste, pale și predispuse la boli, în combinație cu genomul de hookeri (după H. de Vries, 1913, din Rédei, 1986).

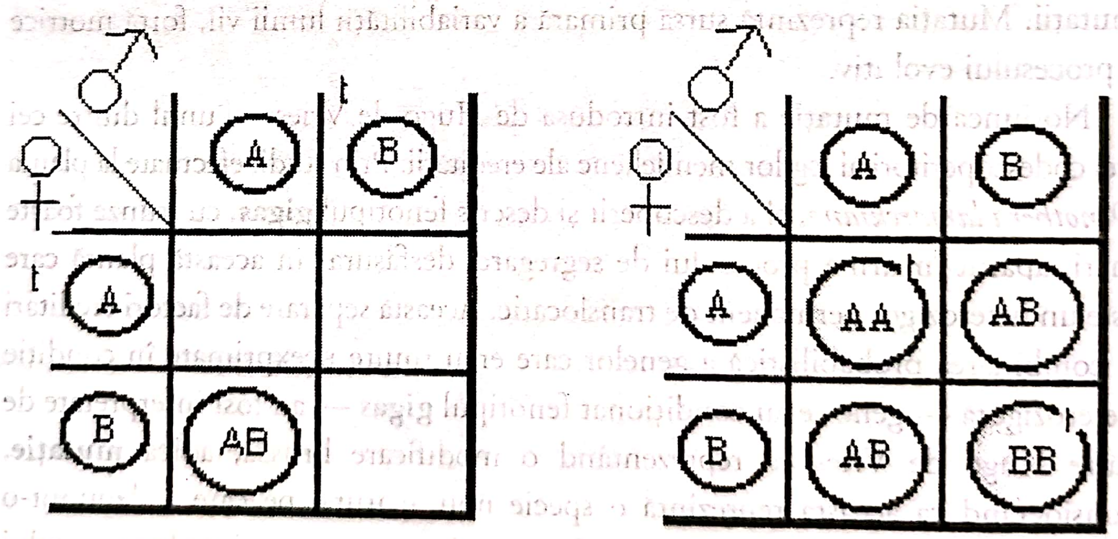


Fig. 1. B Reprezentarea diagramică a letalității gametice (stânga) și zigotice (dreapta). Un factor gametic letal *A* ucide numai ovulul; factorul gametic *B* letal induce sterilitatea polenului și nucleilor spermatici. Ca urmare, numai genitorul femel transmite factorul *B* și numai genitorul patern poate contribui cu *A*. În letalitatea zigotică doar heterozigoții supraviețuiesc. Celulele letale sunt hașurate și marcate cu o cruce (+) (din, Rédei, 1986).

Termenul de **mutație**, deși original a descris un fenomen de segregare, a rămas în știință ca desemnând **o modificare bruscă în structura și funcția materialului genetic.**

Mutații spontane au fost observate de multă vreme, încă din secolul al XVIII-lea, când Duchene a descris fragul monofil. Ulterior, a fost descris salcâmul monofil și o mutație a trandafirului *Rosa monstruosa*. In secolul al XIX-lea, în Massachusetts (SUA), într-o turmă de oi, a apărut un berbec cu picioare scurte. Utilizat la reproducere, s-a obținut rasa de oi *Ancona*. In Argentina există o rasă de vaci fără coarne — *Niata*, apărută prin mutație. În Anglia, s-a descris soiul de grâu *Squarehead*, care a fost creat, pornind de la o mutantă apărută spontan. Există posibilitatea evidențierii mutației la nivelul genotipic, al structurii ADN, secvență genică sau conformația tridimensională (a ADN), apoi, la nivel cromozomal (aberații structural cromozomale sau modificări numeric cromozomale), precum și la nivel fenotipic molecular (conformația macromoleculelor proteinice, precum și eficiența funcționării acestora ca proteine structurale sau ca enzime), la nivel de fenotip celular (eritrocitele în care se sintetizează hemoglobina anormală HbS, ca urmare a unei mutații de substituție a acidului glutamic cu valina, în poziția a 6-a a catenei B, capătă formă de seceră la concentrații reduse de oxigen, condiționând boala numită anemia falciformă sau drepanocitoză), precum și la nivel de fenotip macroscopic (trăsături morfoanatomice, fiziologice și de comportament) al organismului.

La nivel cromozomal, pentru insecte, cel mai avantajos sistem de studiu este sistemul politen (fig. 2) în care fenomenul de împerechere somatică dintre cromozomi în celule somatice, pe bază de omologie strictă a benzilor, poate revela orice alterare a acestui model de benzi, respectiv a structurii cromozomilor (fig. 2), permițând realizarea unui screening populațional eficient al frecvenței și tipului mutațiilor.

Mutațiile sunt schimbări rare, neobișnuite, în natură. In mod normal, materialul genetic e protejat față de acțiunea factorilor mutageni, prin complexare cu proteine, iar leziunile induse în structura ADN sunt supuse proceselor reparatorii.

Detectarea mutațiilor se face la nivel fenotipic. Astfel, la nivelul fenotipului molecular, mutațiile se evidențiază prin: modificarea activității polimerazelor și modificarea amprentelor moleculare (**fingerprinting**).

La nivelul fenotipului cromozomal, mutațiile se evidențiază prin:

– modificarea structurii cromozomilor (remanieri sau aberații cromozomale) și a numărului de cromozomi (mutații genomice, prin aneuploidie și poliploidie);

– creșterea ratei erorilor în replicare și în transcriere;

– modificarea conținutului (secvenței) în aminoacizi a proteinelor.

La nivelul fenotipului organismului, mutațiile conduc la modificarea trăsăturilor morfologice, fiziologice și comportamentale (în cazul animalelor). Tehnicile

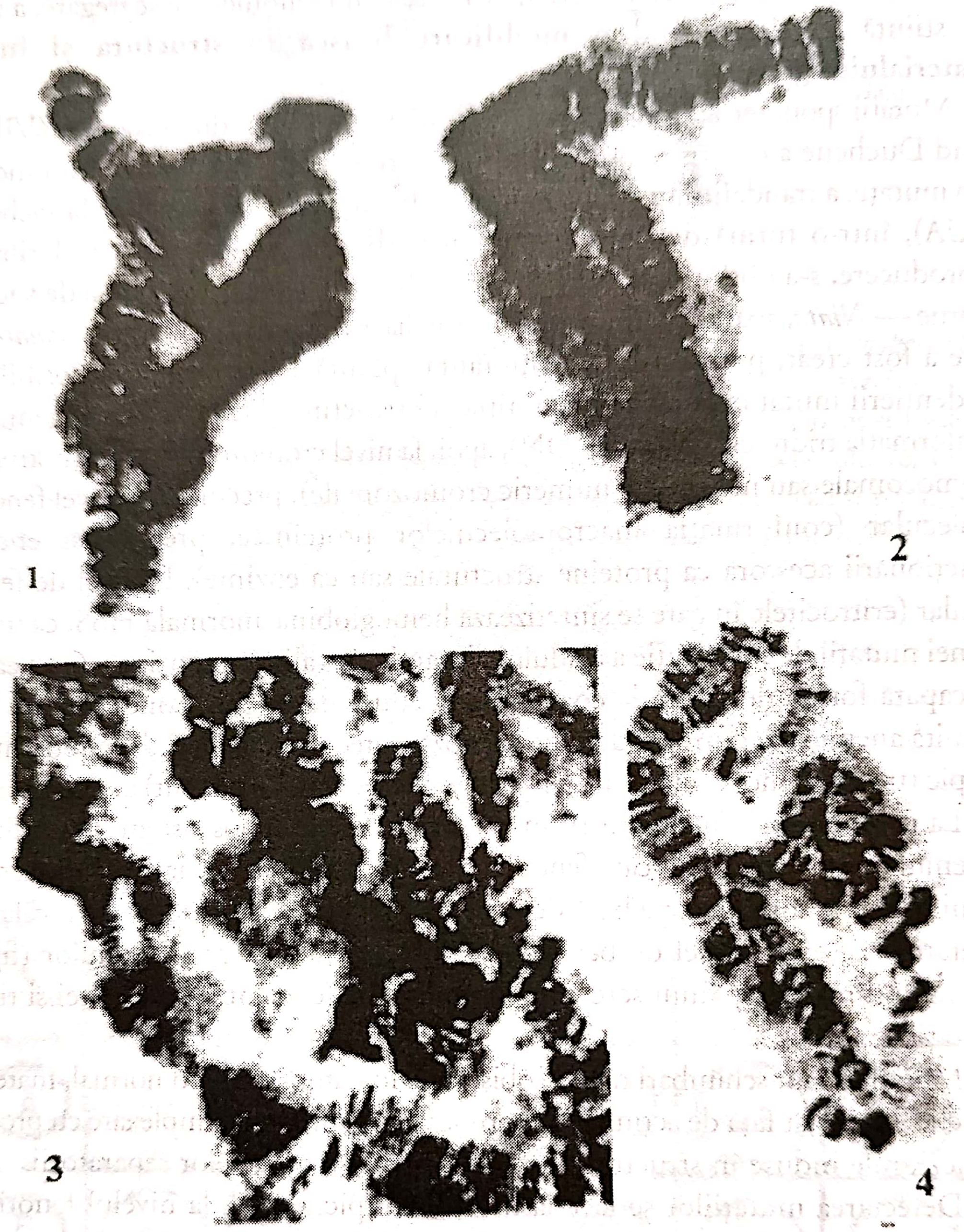


Fig. 2 — Mutații spontane identificate în populații naturale de insecte și evidențiate prin analiza sinapsei somatice, la nivelul cromozomilor politeni.

1. Rearanjament complex, indus de o inversie subtermina; ă, la *Chironomus plumosus*;
2. Bucla de inversie în cromozomul politen de *Chironomus plumosus*;
3. Buclă de inversie paracentrică la insecta *Corethra*;
4. Desinapsie într-unul din cromozomii politeni (stânga sus) de la *Mycetophila agarici* (original).

de secvențiere a ADN au permis detectarea mutațiilor la nivelul secvenței de nucleotide din ADN.

Genetica reversată permite provocarea intenționată și dirijarea unor modificări de baze dintr-o genă in vitro și reintroducerea acesteia în celule, prin tehnologia ADN recombinant, spre a se vedea efectele sale.

Agenții antimutageni sunt substanțe cu efect antagonic mutagenilor și care reduc rata de mutație spontană sau indusă, acționând fie ca **protectori**, fie ca agenți ce facilitează repararea leziunilor premutaționale din ADN.

La bacteria *Escherichia coli*, Adenina și derivații purinici sunt agenți mutageni, pe când ribonucleozidele purinice Adenozina și Guanozina sunt antimutageni.

ADN-polimerazele pot funcționa deopotrivă ca enzime mutatoare, mărind rata erorilor de includere și de împerechere, precum și ca enzime antimutatoare, reducând rata mutației, cu mult sub rata mutației spontane. Agenții radioprotectori precum: cistina, cisteina, tioglicanul, glutationul, etc. reduc frecvența aberațiilor cromozomale induse prin iradiere X. Același efect îl prezintă ACIDUL GIBERELIC, NITRATUL DE CALCIU, ACIDUL ASCORBIC.

Păstrarea îndelungată a semințelor tratate cu mutageni are efect antimutagen. Păstrarea îndelungată a semințelor netratate are efect mutagen, acumulându-se cu timpul produși care își exercită efectul mutagen.

După cantitatea materialului genetic afectat, mutațiile pot fi:

– **genice** — cea mai mică unitate de mutație numită **muton** este perechea de nucleotide. Mutația genică se mai numește și mutație punctiformă;

– **cromozomale** (structural cromozomale);

– **genomice** (numeric cromozomale)

După tipul de celulă în care se produc mutațiile, acestea pot fi:

– **somatice**, afectând celulele corpului și generând o clonă de celule mutante derivate prin diviziuni succesive, pornind de la o celulă somatică care a suferit o mutație.

– **gametice** (germinale), afectând materialul genetic din celulele liniei germinale;

După tipul de genom afectat, mutațiile pot fi:

– nucleare, când afectează genomul nuclear,

– extranucleare sau citoplasmatice, atunci când afectează genomurile extranucleare (din mitocondrii și din cloroplaste);

După sensul modificării genelor, mutațiile pot fi:

– înainte (**forward m.**) când alela dominantă (A sau a^+) devine alelă recesivă (a) $(A \rightarrow a\ a^+ \rightarrow a^-)$

– înapoi (**back m.**), când sensul mutației este de la alela recesivă (a)la alela normală sau de tip sălbatic (A sau a^+)

După exprimarea mutațiilor, acestea pot fi:

– **expresive**, când au efect fenotipic evident;

– **neexpresive**, când nu au efect fenotipic vizibil, chiar în condiții normale de mediu.

După mărimea efectului fenotipic, mutațiile pot fi:

– *micromutații* (efecte fenotipice mici, greu sesizabile);

– *macromutații* (efecte fenotipice extinse, ușor observabile).

Mutațiile genice numite și **mutații punctiforme** apar în urma unor microleziuni în structura ADN, reprezentate de:

– *tranziții*: Pu→Pu sau Py→Py;

– *transversii*: Pu → Py sau Py → Pu. Acestea se mai numesc și mutații de substituție;

– *deleția* (pierderea de nucleotide din secvența genică);

– *adiția* (adăugarea de nucleotide într-o secvență genică).

Macroleziunile sunt modificări mai extinse în materialul genetic și sunt reprezentate prin:

– *pierderi* sau *deficiențe* ale unor segmente cromozomale;

– *duplicații* sau dublări ale unor segmente cromozomale;

– inversii;

– *translocații* sau relocări de segmente cromozomale

Mutațiile care afectează viabilitatea sunt:

– **letale** (se mai numesc și mutații interzise, ele conducând la moartea individului, din chiar momentul apariției — **moarte genetică**)

– **subletale** (**semiletale**), de exemplu gena X-lincată a hemofiliei la om. la sexul femel în stare homozigotă (în dublu exemplar) această genă este letală, iar la sexul mascul, în stare hemizigotă (într-un singur exemplar)este compatibilă cu viața.

– **viabile**;

Mutațiile condițional-letale asigură supraviețuirea organismului între anumite limite ale factorilor de mediu (temperatura, în speță), ducând la moartea individului, de îndată ce asemenea limite sunt depășite. La *Drosophila* și bacterii, unele mutante cresc la 20°C (temperatură permisivă), dar nu și la 37°C (temperatură nepermisivă), aceste mutante sunt condițional termostabile.

Din punct de vedere al necesităților nutriționale, se întâlnesc mutante **auxotrofe** care au cerințe diferite față de tipul normal numit PROTOTROF. Tipul normal (sălbatic) sau prototrof, poate crește pe medii minimale. Mutantele auxotrofe pot crește pe mediu minimal, numai dacă la acesta se adaugă anumiți produși (aminoacizi, nucleotide, vitamine, etc) pe care mutanta respectivă nu îi poate sintetiza singură. Bacteriile de tip sălbatic sunt sensibile la fagi și la antibiotice, pe când cele de tip mutant sunt rezistente la fagi și la antibiotice.

După manifestare în fenotip, mutațiile sunt:

– *dominante* — se manifestă ori de câte ori există, indiferent de prezența (starea heterozigotă **Aa**) sau absența (starea homozigotă **AA**) alelei recesive;

– *semidominante:* alelele diferite ce constituie perechea de factori ereditari se exprimă deopotrivă într-o proporție mai mult sau mai puțin egală. Exemplul tipic este cazul anemiei falciforme (**HbA HbS**) în care alela normală HbA se exprimă într-o proporție de 60%, iar alela mutantă HbS se exprimă în proporție de 40%, la heterozigoți în sângele cărora va fi 60% hemoglobină normală și 40% hemoglobină mutantă. Alela **Hbs** este, așadar, o alelă semidominantă, deoarece se poate exprima, e drept mai puțin pregnant, în prezența alelei normale sau de tip sălbatic **HbA**;

– *recesive*, se manifestă numai în condiție homozigotă, adică atunci când alela recesivă este în dublu exemplar – **aa**, respectiv în absența alelei dominante A (a^+).

Presiunea mutațională reprezintă desfășurarea continuă, într-o populație, a procesului mutațional, direcționat A→a, ceea ce face ca frecvența alelei **a** să fie din ce în ce mai crescută, față de a alelei **A**.

Când mutația A→a se desfășoară în mai multe sensuri și anume a_1, a_2, a_3….a_n, apare fenomenul de ALELISM ÎN TREPTE, descris de către geneticianul rus N.P. Dubinin. Rezultă pe această cale SERII POLIALELE, precum este aceea a culorii ochilor la *Drosophila,* în care alela $\mathbf{w^+}$ determină culoarea roșu-cărămizie a ochilor la tipul normal (sălbatic) de musculiță, și alela **w**, determină, în condiție homozigotă (**ww**) culoarea albă a ochilor, la mutanta „**white**". În cadrul acestei serii polialele se află numeroase alte alele, recesive față de $\mathbf{w^+}$, dar dominante față de w, ce determină diferite nuanțe ale culorii ochilor, precum cireșie (**ch**), sângerie (**bl**), eozin (**e**) etc.

Rata mutației este probabilitatea cu care are loc un eveniment mutațional în cadrul unei populații biologice, la nivelul unei anumite gene, în timpul unui ciclu reproductiv.

Rata mutației se exprimă prin FRECVENȚA MUTAȚIEI. Distribuția frecvenței mutațiilor la nivelul diferitelor gene dintr-un genom sau la nivelul diferitelor situsuri mutaționale, dintr-o genă, se numește SPECTRUL MUTAȚIILOR. Unele situsuri ale genelor suferă mutație cu o rată mult mai mare decât altele și se numesc PETE FIERBINȚI MUTAȚIONALE (e.g. regiunea **rII**, din harta genetică a bacteriofagului T4. O genă de lungime medie are 500-1000 situsuri mutaționale.

În cadrul genomului apar mutații care conduc la pierderea funcției genice (*loss of function*) și mutații de dobândire a unei funcții genice noi (*gain of function*).

2. FACTORI MUTAGENI FIZICI

Acești factori mutageni sunt reprezentați de radiații ionizante, radiații neionizante și radiații corpusculare.

Radiația ionizantă este reprezentată de:

– razele gamma (γ), cu lungimea de undă λ =0,005—1,4Å emise de ^{60}Co;

– razele Röentgen (X), cu lungimea de undă λ = 0.06—100 Å

– radiații corpusculare reprezentate de razele beta (β) sau raze electronice, emise de ^{3}H (tritiu) ^{32}P și ^{35}S, protoni (nuclei de H), neutroni, deutroni, particule α ce iau naștere prin dezintegrarea unor elemente radioactive (nuclei de heliu).

Radiația neionizantă (razele UV) au lungimea de undă λ =136—4000 Å. Razele UV fac parte din spectrul solar invizibil, lumina vizibilă, având peste 4000 Å lungimea de undă.

Razele infraroșii au între 100 și 1000 mm (100.000—1.000.000 Å).

Undele radio (hertziene) au o lungime de undă de peste 1mm, ajungând la sute de metri.

Soarele este cel mai puternic emițător de raze UV. Efectele mutagene cele mai puternice le au razele UV cu λ mai mică de 2900 Å și tocmai această fracție de UV este absorbită de stratul de ozon circumterestru, făcând posibilă existența vieții pe Terra. Razele UV cu λ =2500—3000 Å sunt absorbite de către bazele azotate din acizii nucleici și ele au efectul mutagen cel mai puternic (fig 3).

Radiația cosmică primară este o radiație naturală care scaldă permanent planeta noastră, fiind formată din nuclei de carbon, azot și oxigen.

Radiația cosmică secundară este reprezentată de radiația electromagnetică și corpusculară.

În atmosferă se află gazul RADON. Elementele radioactive din scoarța Pământului se dezintegrează, eliberând radiații. Acestea, împreună cu radiația cosmică

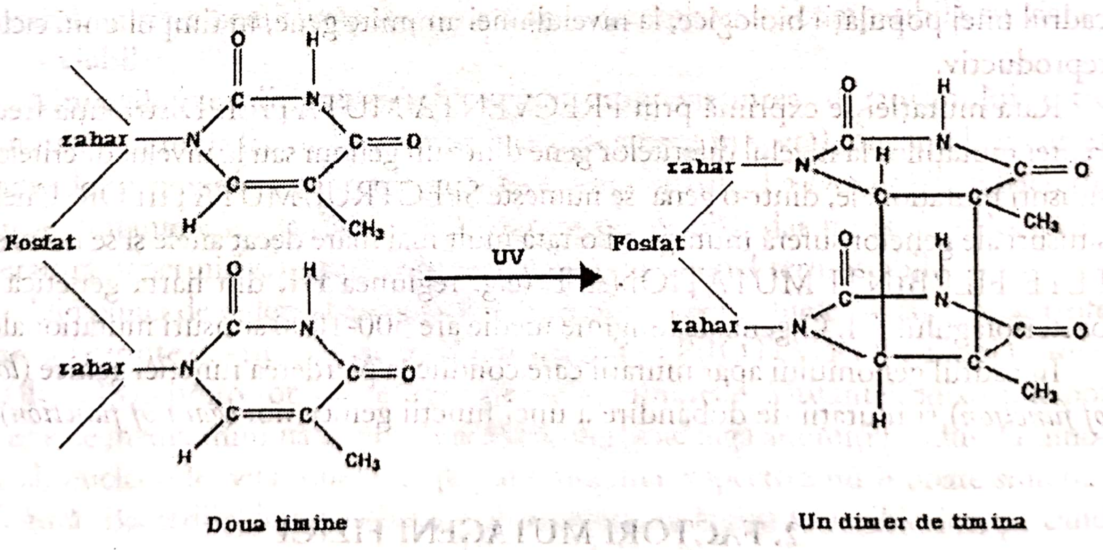


Fig. 3 — Leziuni fotochimice induse de iradierea UV în ADN. Cea mai relevantă asemenea leziune este formarea dimerilor de timină, între două timine așezate una în nemijlocita vecinătate a celeilalte, în aceeași catenă (din Rédei, 1986).

și Radonul, constituie fondul natural de radiații terestre, reprezentând o permanentă sursă de mutageni.

Experiențele cu bomba atomică și accidentele nucleare de tipul celui de la Cernobâl, din anul 1986, adaugă acestui fond un surplus. Distrugerea prin folosirea freonului a stratului de ozon, care atunci când este intact împiedică penetrarea unei părți (celei mai nocive) a radiației ultraviolete spre Pământ, poate avea efecte imprevizibile asupra vieții de pe Terra.

Acțiunea specifică a radiației ionizante determină APARIȚIA UNEI PERECHI DE IONI ÎNTR-UN MEDIU ABSORBANT:

H_2O radiație ionizantă $H_2O^+ + e^-$

→

$H_2O + e^- \rightarrow H_2O^-$

Prin radioliza apei (descompunerea apei, sub acțiunea radiațiilor) rezultă ioni instabili:

$H_2O \rightarrow H^+ + OH^-$

Radicalii radioactivi ai apei se combină dialel, după următoarele reacții:

$H^+ + H^+ \rightarrow H_2$

$H^+ + OH^- \rightarrow H_2O$

$OH^- + OH^- \rightarrow H_2O_2.$

Ei interacționează cu substanțele componente ale structurilor celulare, inclusiv cu ADN. Durata lor scurtă de viață ($2X10^{-7}$ secunde) le permite să străbată doar o foarte limitată distanță (30-50 Å), ceea ce explică de ce efectul iradierii nu este atât de grav, în toate cazurile.

Radiațiile ionizante rup inelele purinice și pirimidinice, ceea ce oferă posibilitatea realizării de numeroase substituții chimice.

Compușii care conțin grupări SH devin radioprotectori, prin fixarea radicalilor liberi ce apar în urma iradierii, protejând materialul ereditar sau interacționează cu biomoleculele legate, asigurând repararea lor.

Röentgen-ul (R) măsoară doza de radiații, reprezentând cantitatea de radiații capabile de a produce $2{,}08X10^9$ perechi de ioni, într-un cm^3 de aer, la 0°C și 760mg Hg. In țesutul viu, cantitatea de radiații ce corespunde unei unități R este de o mie de ori mai mare, adică de $2{,}08X10^{12}$. Astăzi, pentru măsurarea dozei de radiații se utilizează **RAD** (**R**adiation **A**bsorbed **D**ose) adică doza absorbită de 1g de materie vie, la impactul acesteia cu radiația.

Rezistența organismelor la radiații este foarte diferită, având specificitate de specie.

Bacteria *Pseudomonas* pare a fi cel mai rezistent organism la radiații, de vreme ce a crescut bine, chiar și în apa în care era imersionat reactorul nuclear de la Los

Alamos (S.U.A.), dezvoltându-se atât de puternic, încât tulbura această apă, doza de iradiere atingând valori de până la 10.000.000 R.

O altă bacterie,„*Micrococcus radiodurans*„ este rezistentă la iradieri mai intense decât cele emise de centurile de radiații ale Pământului. Alga *Chlorella* rezistă la iradieri cu doze de câteva milioane de R. Musca rezistă la sute de mii de R. Scorpionul are o rezistență neobișnuită la iradiere, probabil datorită formei circulare a cromozomilor săi.

In practica iradierii se utilizează parametrul DL$_{50}$ (doza limită 50) adică doza la care 50% dintre organismele supuse iradierii mor, iar la celelalte 50% de supraviețuitori apare un procent maxim de mutații.

DL$_{50}$ pentru câteva specii	
Plante	**Animale**
600-900 R brad	325 R câine
7000 R cânepă	450 R om
8000 R fasole	530 R șoarece
10.000-15.000 R secară	850 R șobolan
30.000 R napi	1000 R broască țestoasă
40.000 R tomate	3000 R salamandră
50.000 R in	4600 R drosofilă
	35.000 R parameci

Organismele pigmentate (*Aspergillus niger*) sunt mai rezistente la iradiere decât cele nepigmentate (*A. nidulans*)

Frecvența mutațiilor provocate prin iradieri succesive cu doze mici este echivalentă cu aceea rezultată dintr-o iradiere singulară, cu însumarea dozelor parțiale, concluzie deosebit de importantă pentru practica medicală, unde iradierea este utilizată în scop terapeutic (radioterapie) sau de diagnosticare.

Iradierea afectează celula, mai ales în cursul diviziunii celulare, producând diferite anomalii mitotice. Interesant apare faptul că și unele substanțe chimice cum sunt agenții alchilanți, precum mitomicina c, induc mutații asemănătoare celor apărute în urma iradierii, din care cauză se spune că ele au efect radiomimetic (fig. 4). Restructurările cromozomale care apar în urma efectului primar al iradierii — fragmentarea cromatidei cromozomului — sunt de o mare diversitate (fig. 4), cele mai multe producând moartea celulară (sterilizarea celulară). Cele mai favorabile sisteme biologice pentru evidențierea efectelor mutagene

/clastogene ale radiațiilor ionizante sunt cromozomii meiotici, la care apar în urma remanierilor cromozomale induse de iradiere modificări ale sinapsei cromozomilor omologi aflați în asociații în bivalenți. Rearanjamentele cromozomale (deleții, inversii, translocații, duplicații) alterează omologia cromozomală, ceea ce se reflectă în modificarea morfologiei bivalenților meiotici, la nivelul cărora pot apare bucle simetrice de inversie, bucle asimetrice de deleție, asocieri atipice, anormale, în urma translocațiilor, desinapsie, asinapsie, multivalenți, univalenți, etc.

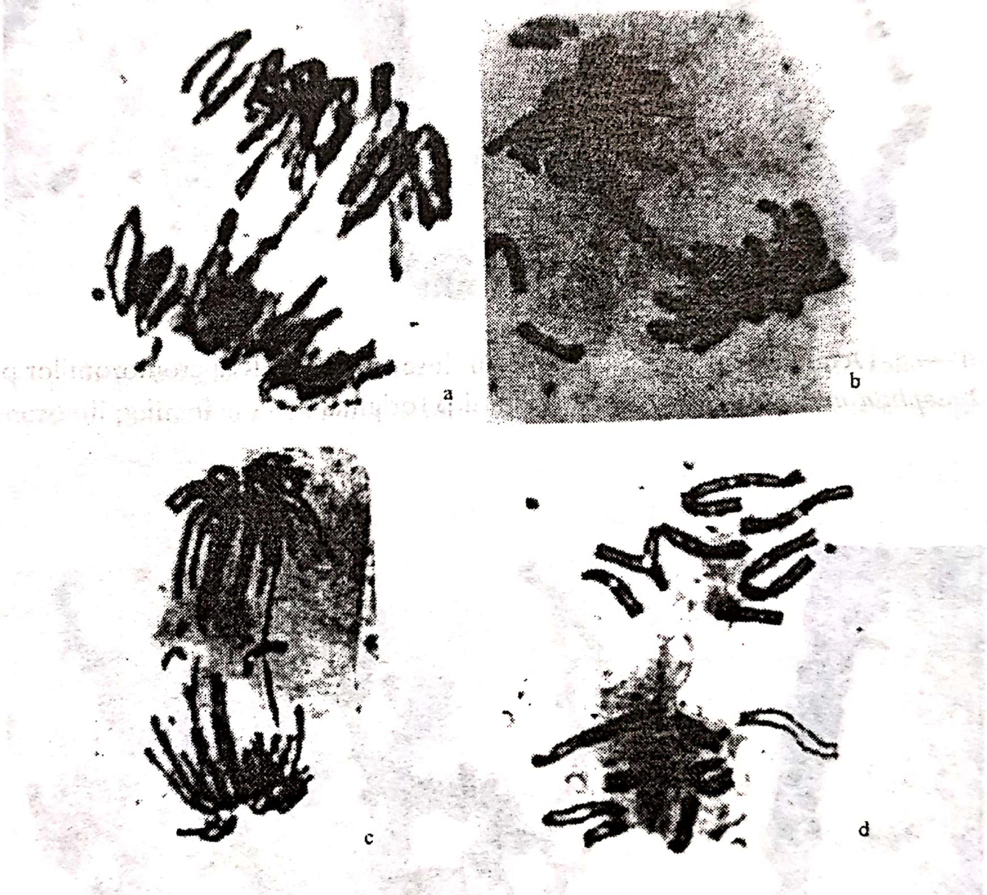


Fig. 4 — Acțiunea radiațiilor electronice β (a,b) și efectul radiomimetic (c,d) al agentului alkilant mitomicina C asupra materialului genetic vegetal (*Allium cepa*):

a. Anafază cu punte cromatică care conduce la repartizarea anormală a cromozomilor în celule fiice;

b. Telofază cu o punte cromatică, doi cromozomi retardatari (rămași în urmă, la ecuatorul fusului de diviziune, pe când restul cromozomilor a ajuns la polii opuși) și doi cromozomi înaintați;

c. Anafază cu multiple punți cromatidice și multipli cromozomi retardatari;

d. Translocația a doi cromozomi prin telomerele lor, rezultând cromozomi cu doi centromeri (dicentrici) precum și translocația unui cromozom prin telomere la nivelul breșei create prin ruptură cromozomală (stânga sus) (original).

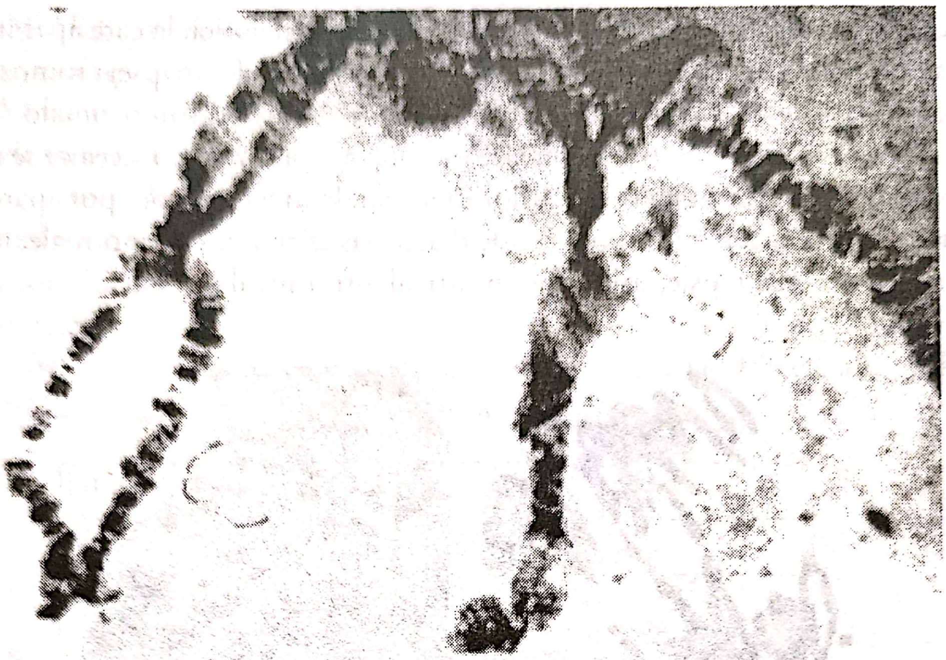


Fig. 4 — e. Detaliu al buclelor de inversie induse în brațul 3R al cromozomilor politeni de *Drosophila melanogaster*, în urma iradierii β (original).

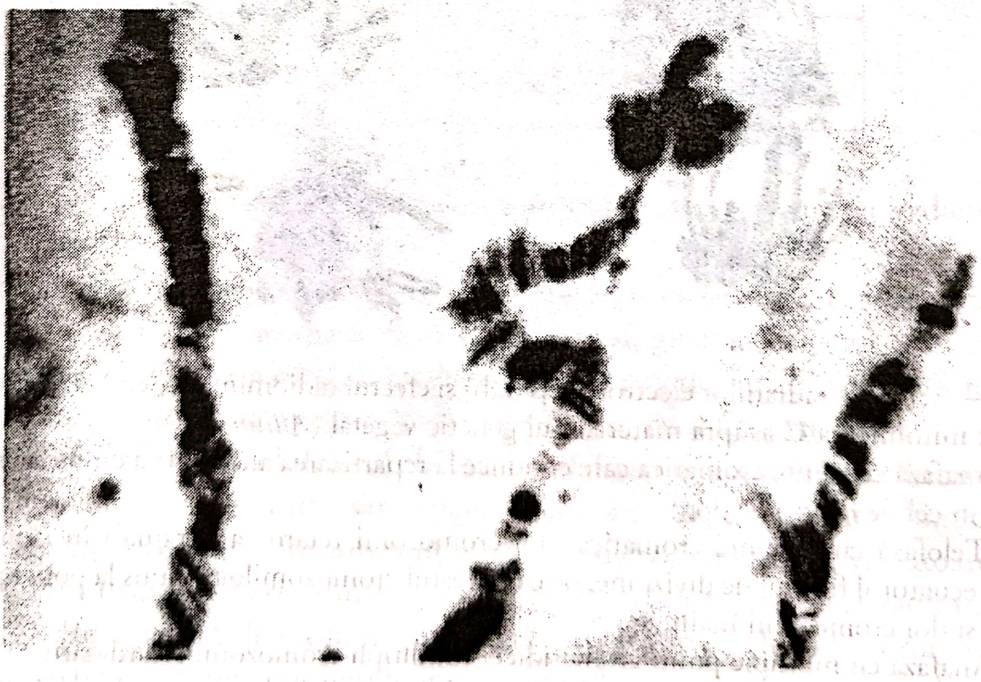


Fig. 4 — f. Buclă de deleție indusă în cromozomi politeni de *Drosophila melanogaster* în urma iradierii cu raze β (original).

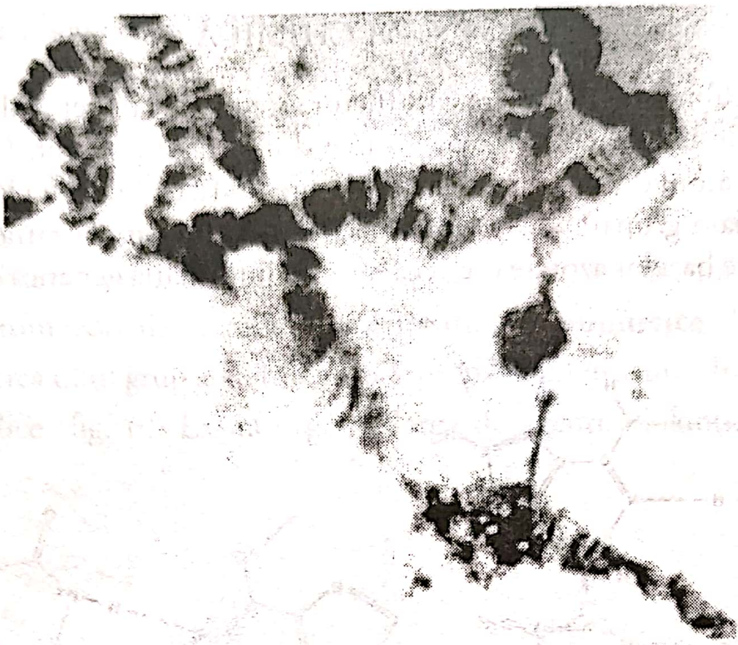


Fig. 4 — g. Legături ectopice intercromozomale și buclă de inversie intercalară induse în cromozomii politeni la *Drosophila melanogaster*, în urma iradierii cu raze β (original).

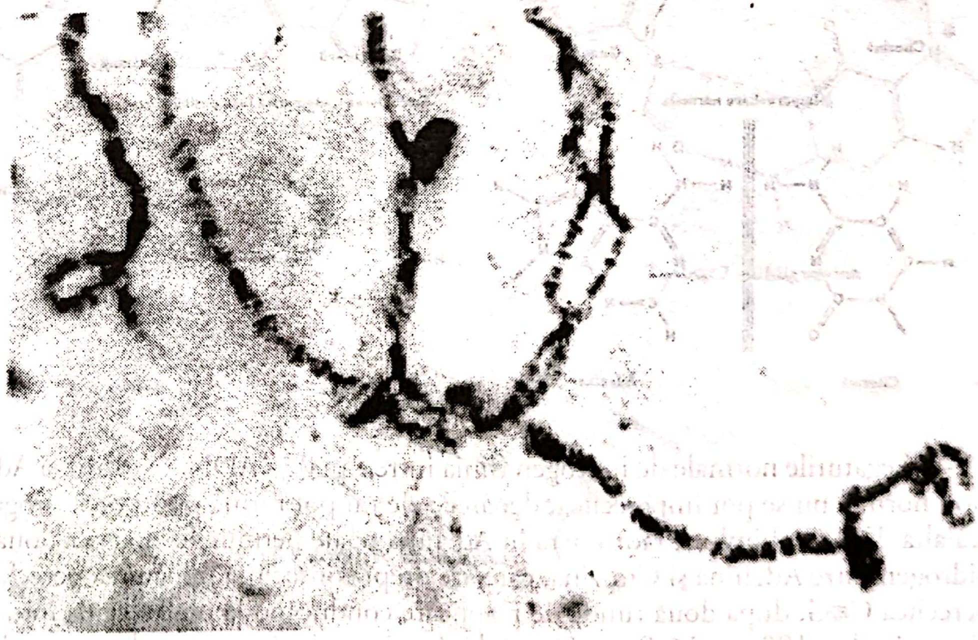


Fig. 4 — h. Bucle de inversie în brațul 3R la cromozomii politeni de *Drosophila melanogaster*, în urma iradierii cu raze β (original).

3. MUTAGENEZĂ CHIMICĂ

Un fenomen chimic care interferă cu structura și funcțiile materialului genetic este reprezentat de tautomeria bazelor azotate din structura ADN. O mișcare tautomeră a unui atom de hidrogen de la o grupare NH2 extrainelară la un atom de N inelar, sau la o grupare =C=O intrainelară modifică proprietățile normale de împerechere ale bazelor azotate ceea ce alterează informația genetică conținută în ADN (fig. 5).

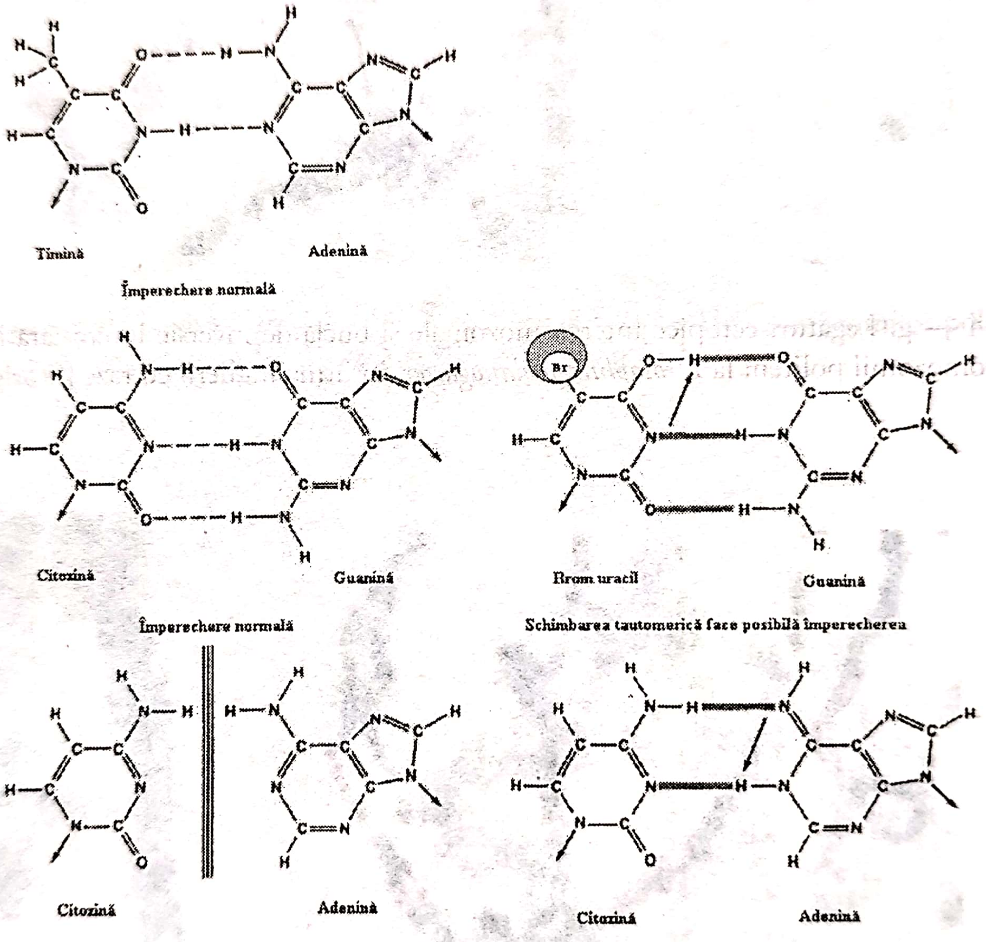
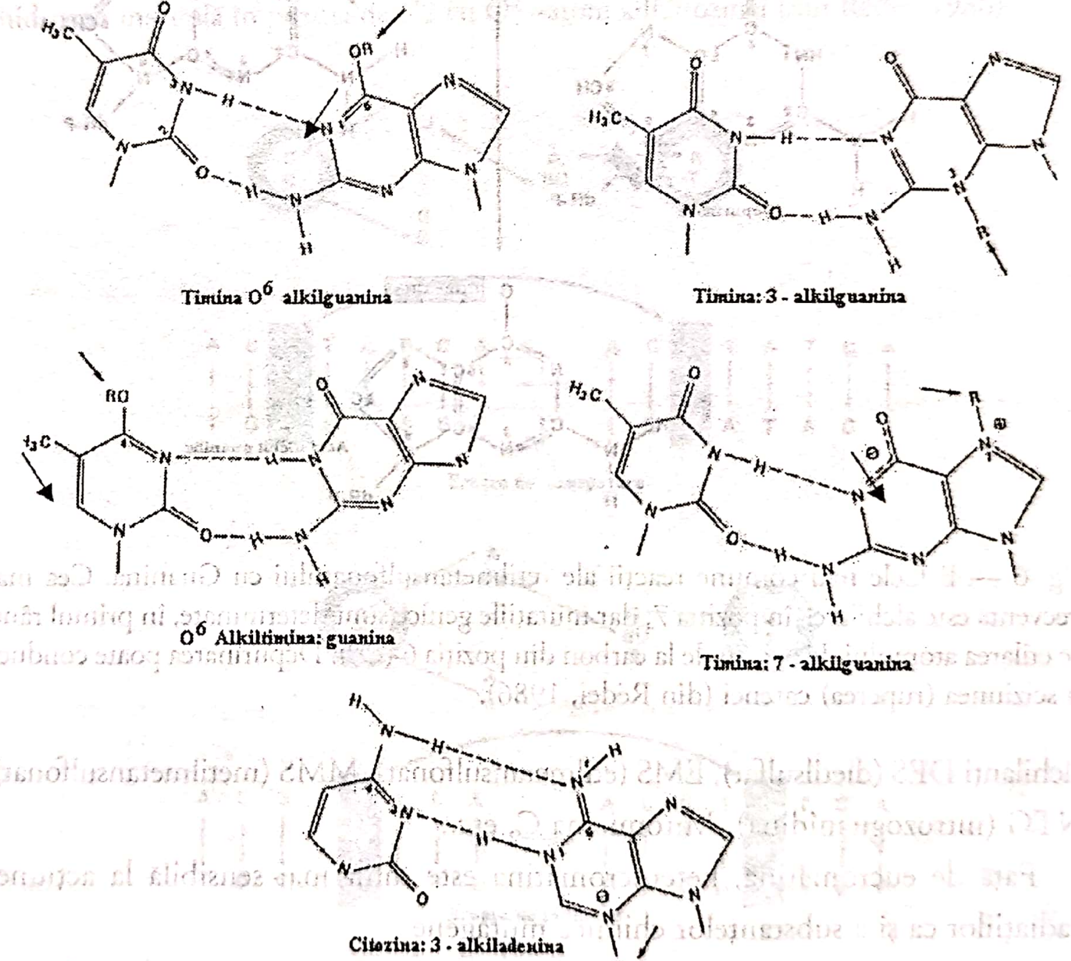

Timină
Adenină
Împerechere normală
Citozină
Guanină
Împerechere normală
Br
Brom uracil
Guanină
Schimbarea tautomerică face posibilă împerecherea
Citozină
Adenină
Citozină
Adenină

Fig. 5 — Legăturile normale de hidrogen (linia intreruptă) în ADN. Citozina și Adenina, în mod normal nu se pot împerechea, deoarece ele nu pot forma punți de hidrogen una cu cealaltă. Dar o schimbare tautomeră în Adenină poate permite formarea a două punți de hidrogen între Adenină și Citozină, care are drept consecință înlocuirea perechii A=T cu perechea C≡G, după două runde de reaplicare conducând la modificarea informației ereditare. Analogul Timinei 5-Brom Uracilul înlocuiește Timina în perechea normală A=T, dar el se împerechează normal cu Guanina, conducând la modificarea informației genetice, prin înlocuirea perechii A=T cu perechea G=C, după două runde de replicare, de la evenimentul substituției Timinei din perechea A=T.

Există o gamă largă de substanțe chimice mutagene, de la cele mai puțin obișnuite — gazele de luptă (iperita — agent alkilant), la cele utilizate în controlul pestelor — pesticide, până la medicamente (sulfamida, acidul ascorbic, ciclamatul de sodiu), aditivi alimentari, produse cosmetice sau extracte din unele plante.

Mutagenii chimici produc aberații cromozomale de tip cromozomal, cromatidic și subcromatidic, ca și mutații genice. Cele care, asemănător radiațiilor, produc rupturi cromozomale, se numesc **substanțe radiomimetice**. Alkilarea înseamnă introducerea unui grup alkil (metil, etil, propil, etc.) într-una dintre componentele nucleotidice (fig. 6). Există o gamă largă de agenți alkilanți. Așa sunt agenții


Timina O^6 alkilguanina

Timina: 3 - alkilguanina

O^6 Alkiltimina: guanina

Timina: 7 - alkilguanina

Citozina: 3 - alkiladenina

Fig. 6 — Alkilarea bazelor azotate din ADN (R = alkil) conduce la alterarea proprietăților de împerechere a acestora. O diversitate de agenți alkilanți (sulfonați, compuși nitrozo etc.) pot afecta bazele azotate, așa cum se prezintă mai sus (după Lawley, 1974).

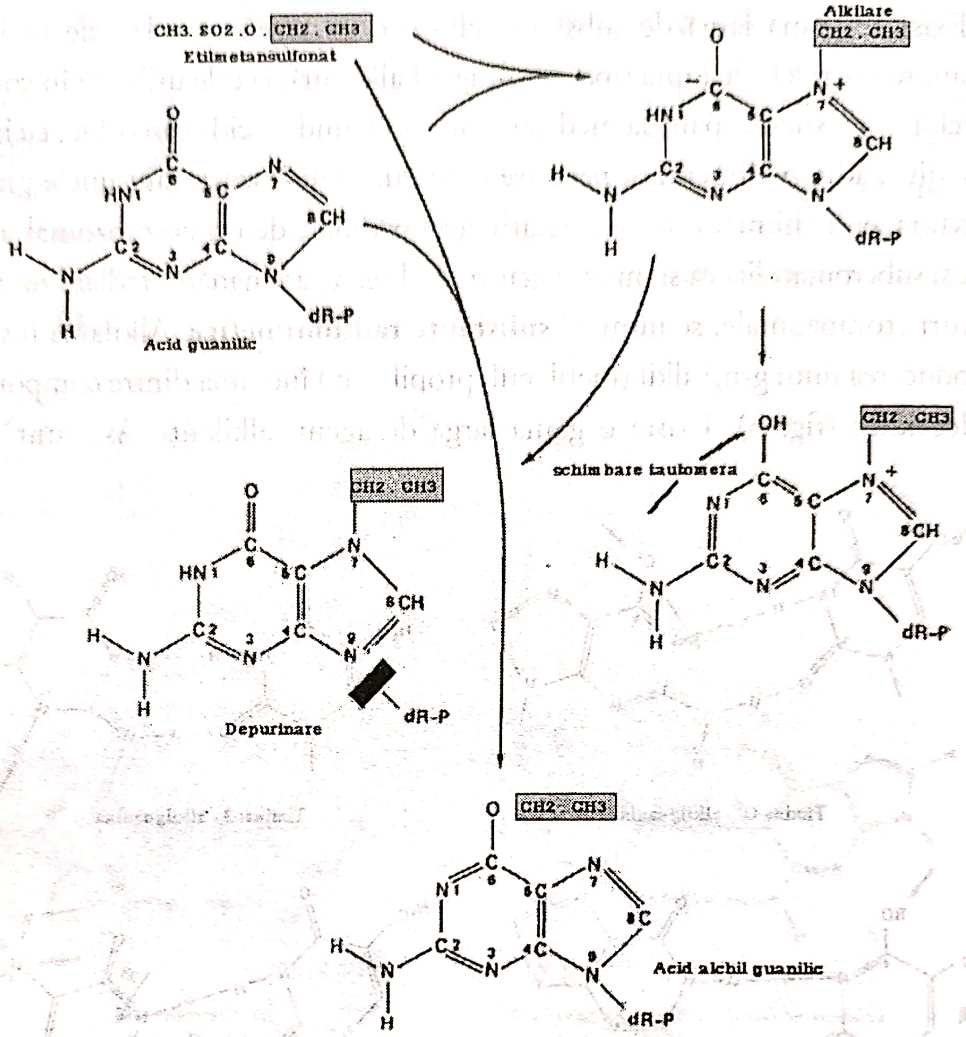

CH3. SO2 .O . CH2 . CH3
Etilmetansulfonat
Alkilare
CH2 . CH3
Acid guanilic
schimbare tautomera
Depurinare
Acid alchil guanilic
dR-P

Fig. 6 — B Cele mai comune reacții ale etilmetansulfonatului cu Guanina. Cea mai frecventă este alchilarea în poziția 7, dar mutațiile genice sunt determinate, în primul rând de etilarea atomului de oxigen de la carbon din poziția 6 (O^6). Depurinarea poate conduce la sciziunea (ruperea) catenei (din Rédei, 1986).

alchilanți DES (dietilsulfat), EMS (etilmetansulfonat), MMS (metilmetansulfonat), NTG (nitrozoguanidina), Mitomicina C, etc..

Față de eucromatină, heterocromatina este mult mai sensibilă la acțiunea radiațiilor ca și a substanțelor chimice mutagene.

Analogii bazelor azotate precum 5 –bromuracilul, analog al timinei (fig. 7A) interferă cu replicarea ADN, producând gap-uri, rupturi cromozomale și mutații genice. Un alt analog al bazelor azotate este 2-aminopurina (fig. 7B) care determină erori de împerechere. Tot astfel, deoxi-adenozina induce fragmentări cromozomale

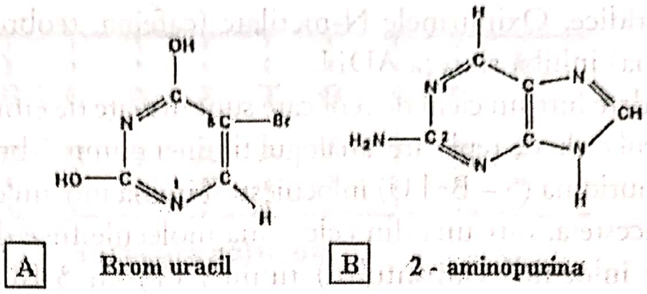

OH
N
C
C—Br
HO—C
N
H
H
N
C
N
CH
H₂N—C2
N
H
A
Brom uracil
B
2 - aminopurina

Fig. 7 — A. *Bromuracilul* (5-Bromodeoxiuridina 5 Brd U) este cel mai utilizat analog al bazei azotate timina. Bromuracilul este supus unei mişcări tautomere care îi permite să realizeze o împerechere cu guanina prin trei punţi de hidrogen;

B. 2-*Aminopurina* este analog al Adeninei care poate forma o singură punte de hidrogen instabilă în poziţia de C2 cu O^2 –atom al Citozinei (din Rédei, 1986).

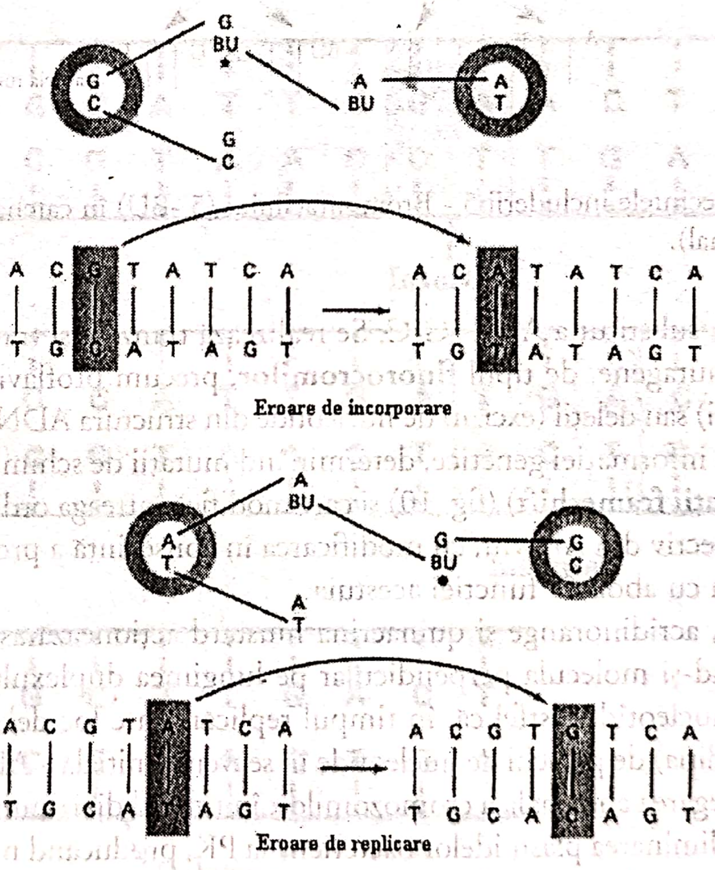

G
BU
*
G
C
A
BU
A
T
G
C
A C G T A T C A
T G C A T A G T
A C A T A T C A
T G T A T A G T
Eroare de incorporare
A
BU
A
T
G
BU
G
C
A
T
A C G T A T C A
T G C A T A G T
A C G T G T C A
T G C A C A G T
Eroare de replicare

Fig. 8. Inducţia mutaţiei prin erori de incorporare (*) şi erori de replicare(.) în prezenţa analogului bazei azotate bromuracil (BU) A=Adenină, T=Timină, G=Guanină şi C=Citozină. În ambele cazuri, rezultatul final este substituirea unei perechi de baze la un situs specific din ADN săvârşită în trei etape replicative (din Rédei, 1986).

și rupturi cromatidice. Oxipurinele N-metilate (cafeina, teobromina, teofilina, 1,3-dimetilxantina) inhibă sinteza ADN.

Erori de includere într-un ciclu de replicare sunt urmate de erori de împerechere (fig.8) în următorul ciclu de replicare: analogul timinei numit 5-bromuracil (5-BU) sau 5-bromodeoxiuridina (5 – Brd U) înlocuiește Timina într-un ciclu de replicare, substituindu-se acesteia, într-una din cele două molecule fiice de ADN.

Evenimentele înlocuirii (substituirii) timinei (T) cu 5-BU sunt redate în figura 9):

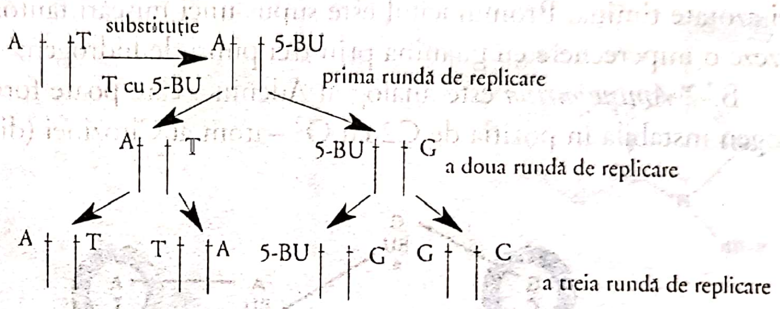


Fig. 9 — Consecințele includerii 5 - Bromouracilului (5 -BU) în catena ADN, în locul Timinei (original).

Are loc, astfel, substituția A-T→G-C. Se realizează tranziții și transversii. Există și substanțe mutagene, de tipul **fluorocromilor**, precum proflavina, care induc adiții (adăugări) sau deleții (excizii) de nucleotide din structura ADN, cu consecințe majore asupra informației genetice, determinând mutații de schimbare a cadrului de citire (**mutații frameshift**) (fig. 10) și care modifică întreaga ordine a codonilor din genă, respectiv din ARNm, cu modificarea în consecință a produsului genic, cel mai adesea cu abolirea funcției acestuia.

Proflavina, acridinorange și quinacrina mustard acționează asupra resturilor fosfat, inserându-și molecula perpendicular pe lungimea duplexului ADN, între perechile de nucleotide, astfel că, în timpul replicării, are loc deleția (pierderea) sau inserția (adiția) de perechi de nucleotide în secvența inițială a ADN. Acridinele provoacă segregarea anormală a cromozomilor, în timpul diviziunii celulare la EK și determină eliminarea plasmidelor bacteriene la PK, producând mutații specifice în genele extranucleare din kinetoplastul de *Crythridia* și *Leishmania* și în mitocondriile celorlalte eucariote.

Acidul nitros este agent mutagen foarte eficient la virusuri, bacterii și ciuperci, determinând DEAMINAREA bazelor azotate (fig. 11), ceea ce induce următoarele modificări mutagene:

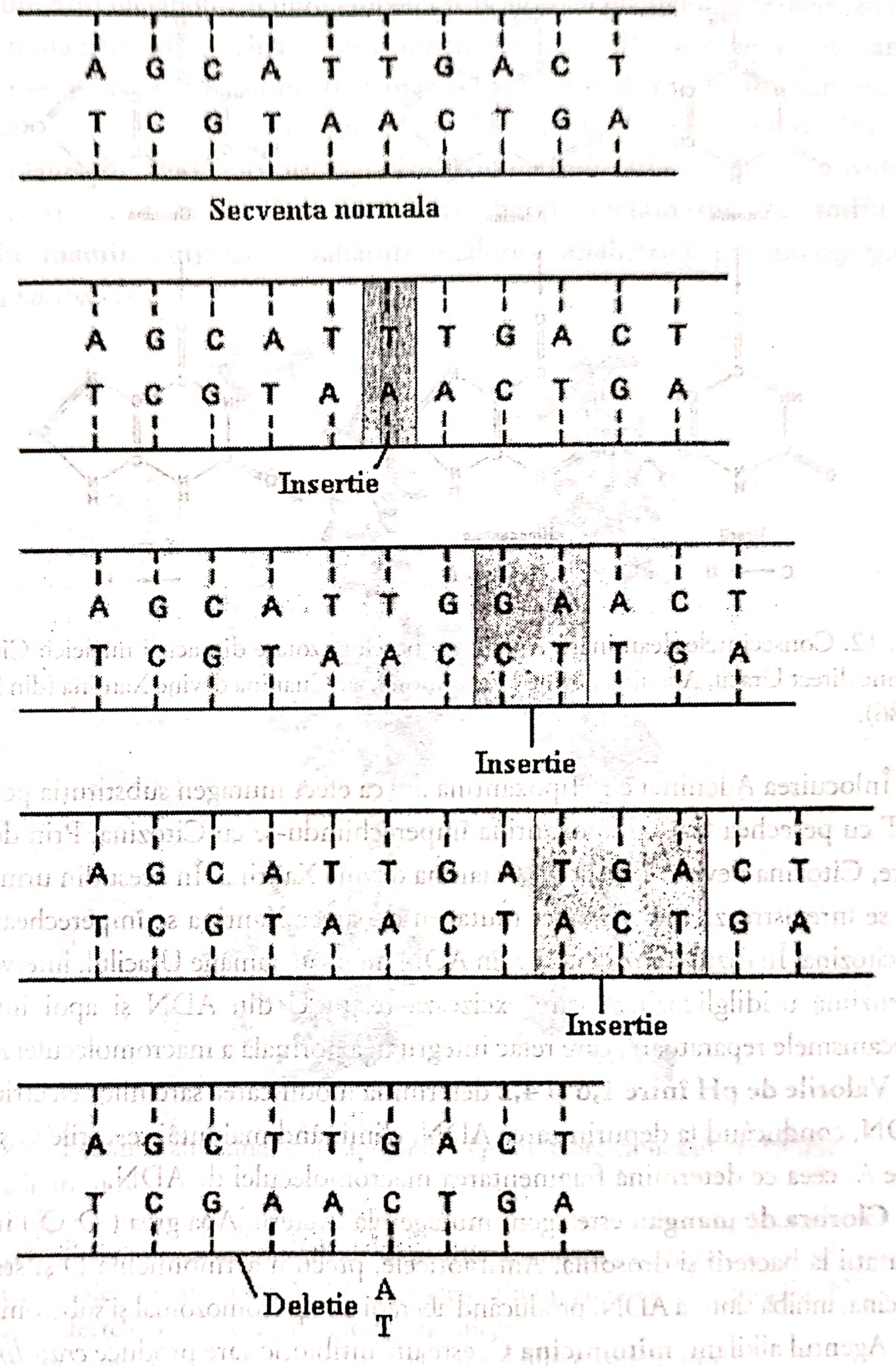

A G C A T T G A C T
T C G T A A C T G A
Secventa normala
A G C A T T T G A C T
T C G T A A A C T G A
Insertie
A G C A T T G G A A C T
T C G T A A C C T T G A
Insertie
A G C A T T G A T G A C T
T C G T A A C T A C T G A
Insertie
A G C T T G A C T
T C G A A C T G A
Deletie
A
T

Fig. 10. Mutații *frameshift* sunt datorate inserției sau deleției de perechi de baze în, respectiv din, catenele polideoxiribonucleotidice ale ADN. Asemenea mutații au loc mai ales la nivelul segmentelor în care se află repetiția aceleiași baze azotate (din Rédei, 1986)

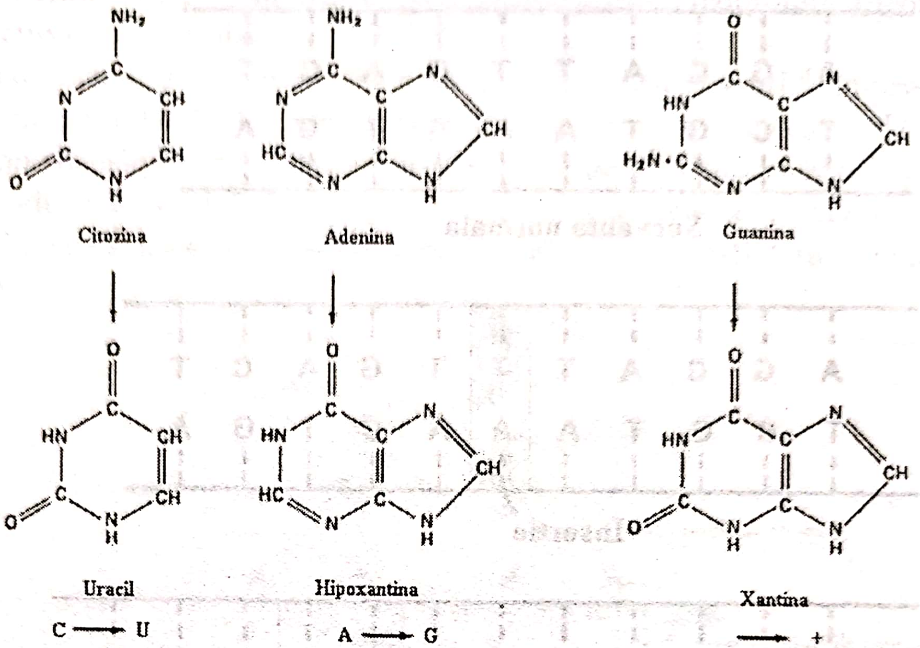


Fig. 12. Consecințele deaminări oxidative a bazelor azotate din acizii nucleici: Citozina devine direct Uracil, Adenina devine Hipoxantină, iar Guanina devine Xantină (din Rédei, 1986).

Înlocuirea Adeninei cu Hipoxantina are ca efect mutagen substituția perechii A-T cu perechea G-C, Hipoxantina împerechiindu-se cu Citozina. Prin deaminare, Citozina devine Uracil, iar Guanina devine Xantina. În acest din urmă caz, nu se înregistrează nici un efect mutagen deoarece Xantina se împerechează tot cu citozina. În cazul tranziției C-U, în ADN nu poate rămâne Uracilul, intervenind o enzimă uridilglicozilaza care excizează restul U din ADN și apoi intervin mecanismele reparatoare, care refac integritatea normală a macromoleculei ADN.

Valorile de pH între 1,6 și 4,2 determină modificarea sarcinilor electrice din ADN, conducând la depurinizarea ADN, eliminând mai întâi resturile G și apoi cele A, ceea ce determină fragmentarea macromoleculei de ADN.

Clorura de mangan este agent mutagen la bacterii. Apa grea (D_2O) induce mutații la bacterii și drosofila. Antibioticele, precum actinomicina D și streptomicina, inhibă sinteza ADN, producând aberații de tip cromozomal și subcromatidic.

Agentul alkilant, **mitomicina C**, este un antibiotic care produce *cross-links* — legături încrucișate-, apoi legături covalente, între o bază dintr-o catenă și o bază din catena complementară, ceea ce împiedică separarea catenelor în cursul replicării ADN, cu distorsionarea locală a ADN.

Numeroşi metaboliţi ai unor ciuperci şi alcaloizi ai plantelor superioare au acţiune mutagenă: **necatorina** — din ciuperca comestibilă *Lactorius necator;* **anatabina** — alcaloid din tutun; **heroina; acidul gosipal**, extras din seminţe de bumbac şi utilizat ca anticoncepţional în China; **antrachinone** produse de către unele plante din familia Rubiaceae; **bisulfitul de sodiu** (decolorant, antioxidant şi bacteriostatic în vinificaţie, sucuri, bere); **ciclamatul de sodiu** şi **ciclohexinamina**, utilizate ca zaharuri necalorice; **analgezice**, precum *cafergotul* şi *spasmocibalgina*.

Fig. 12 — Efectul stamokinetic al Lindanului (γ-hexaclorciclohexan- γ–HCH).

a. „figuri în X";

b. dublarea garniturii de cromozomi 2n=2x=32, după cel de al doilea ciclu celular. Dacă γHCH acţionează în continuare, se realizează dublarea cu fiecare nou ciclu celular a numărului de cromozomi. Când însă nucleii ating grade înalte de ploidie (8X, 16X, 32X) apar efectele negative ale mutaţiei genomice;

c. punte cromatică dublă între doi nuclei-fii, rezultaţi prin amitoză;

d. „explozia" nucleului hiperploid. Pedicelii cromatici care leagă nucleii mai mici rezultaţi prin dezintegrarea nucleului mare reprezintă punţi cromatice, consecinţă a translocaţiilor (original).

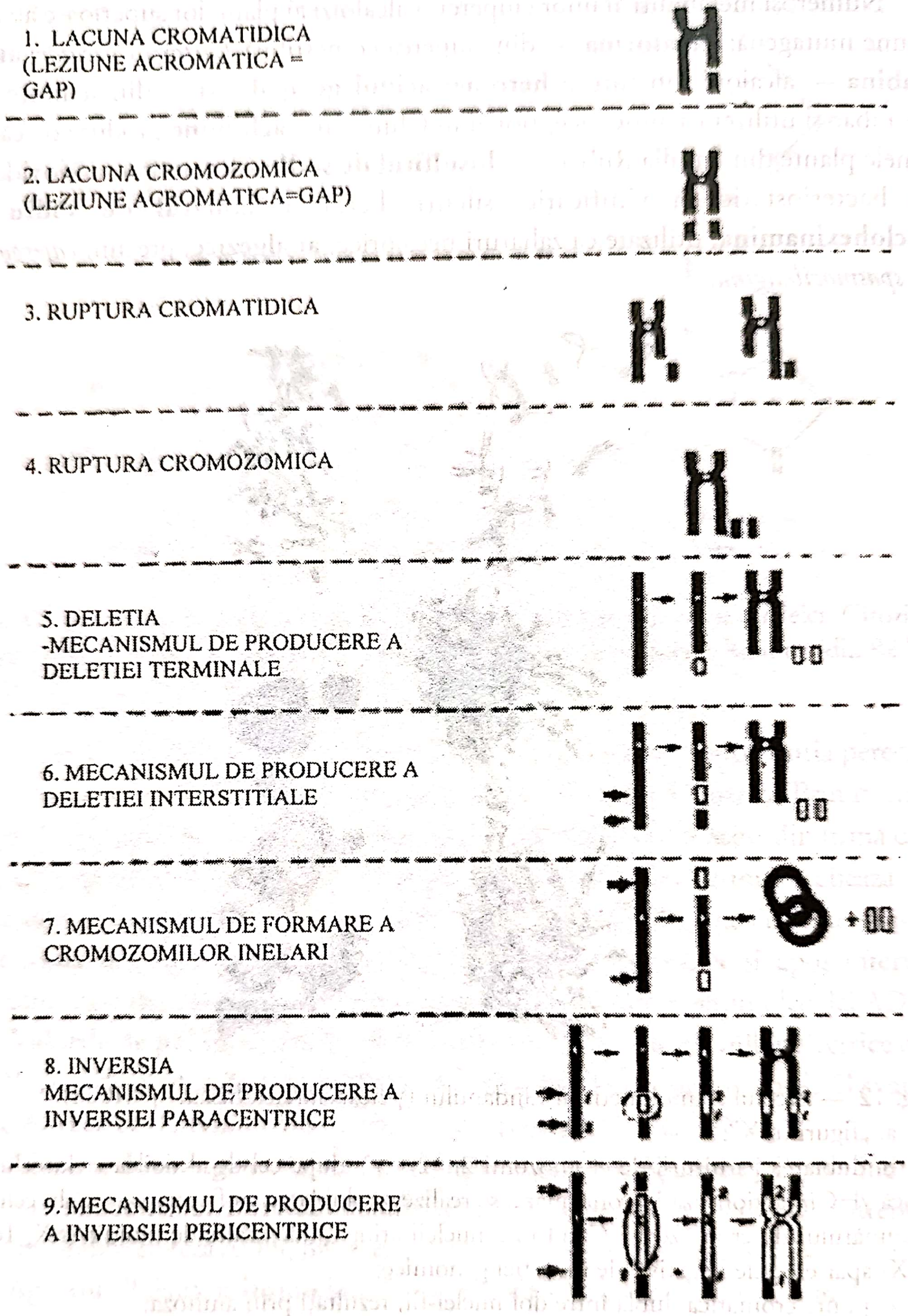

1. LACUNA CROMATIDICA
(LEZIUNE ACROMATICA =
GAP)
2. LACUNA CROMOZOMICA
(LEZIUNE ACROMATICA=GAP)
3. RUPTURA CROMATIDICA
4. RUPTURA CROMOZOMICA
5. DELETIA
-MECANISMUL DE PRODUCERE A
DELETIEI TERMINALE
6. MECANISMUL DE PRODUCERE A
DELETIEI INTERSTITIALE
7. MECANISMUL DE FORMARE A
CROMOZOMILOR INELARI
+
8. INVERSIA
MECANISMUL DE PRODUCERE A
INVERSIEI PARACENTRICE
9. MECANISMUL DE PRODUCERE
A INVERSIEI PERICENTRICE

Fig. 13 — a) Schema rearanjamentelor (remanierilor) cromozomale din cromozomii eucariotelor și a mecanismelor de geneză a acestora

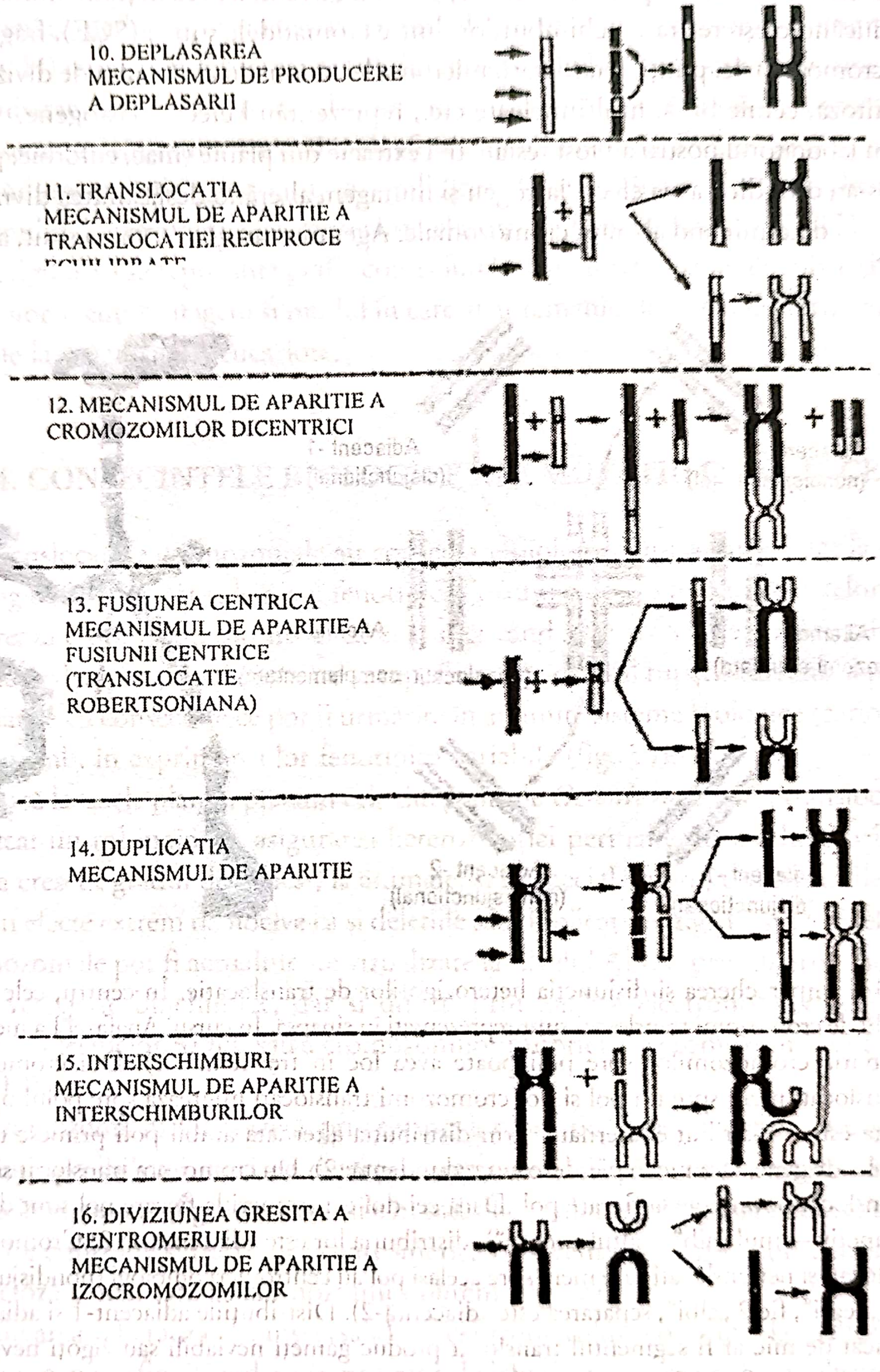

10. DEPLASAREA
MECANISMUL DE PRODUCERE
A DEPLASARII
11. TRANSLOCATIA
MECANISMUL DE APARITIE A
TRANSLOCATIEI RECIPROCE
ECHILIBRATE
12. MECANISMUL DE APARITIE A
CROMOZOMILOR DICENTRICI
13. FUSIUNEA CENTRICA
MECANISMUL DE APARITIE A
FUSIUNII CENTRICE
(TRANSLOCATIE
ROBERTSONIANA)
14. DUPLICATIA
MECANISMUL DE APARITIE
15. INTERSCHIMBURI,
MECANISMUL DE APARITIE A
INTERSCHIMBURILOR
16. DIVIZIUNEA GRESITA A
CENTROMERULUI
MECANISMUL DE APARITIE A
IZOCROMOZOMILOR

Fig. 13 — b) Schema rearanjamentelor (remanierilor) cromozomale din cromozomii eucariotelor şi a mecanismelor de geneză a acestora

Dintre cele 228 de pesticide testate, 50 s-au dovedit a avea acțiune mutagenă, producând creșterea ratei schimburilor dintre cromatidele surori (SCE), fragmentări cromozomale, punți, retardatari, micronuclei, anomalii ale fusului de diviziune, C-mitoză, celule bi- și multinucleate etc., reprezentând efecte clastogene.

În laboratorul nostru au fost testate trei extracte din plante (mac, euforbie, pelin) care s-au dovedit a avea efect clastogen și mutagen, alterând desfășurarea diviziunii cel [illegible] determinând aberații cromozomale. Agenții mutageni chimici sunt, așadar

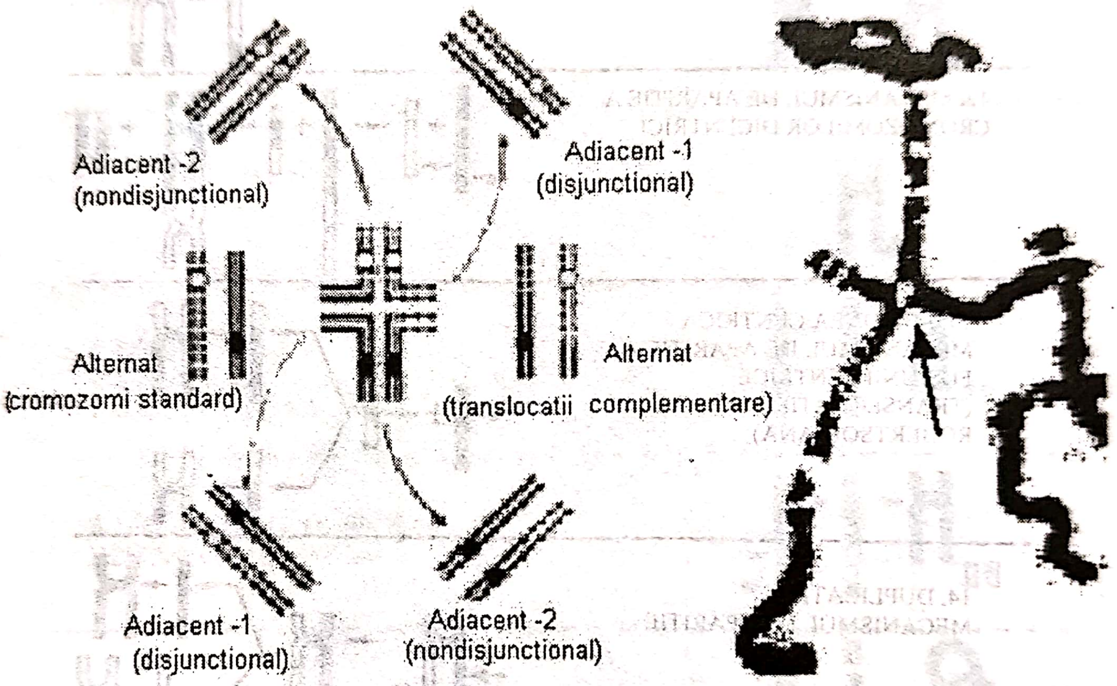


Fig. 14. Împerecherea și disjuncția heterozigoților de translocație. În centru, cele două perechi de cromozomi translocați sunt reprezentați în sinapsă. În cursul Anafazei I a meiozei, distribuția cromozomilor spre poli poate avea loc în trei feluri: 1). Doi cromozomi netranslocați merg spre un pol și doi cromozomi translocați migrează spre polul opus și aceasta este o distribuție alternată. Prin distribuția alternată ambii poli primesc un set complet de gene, fără nici o pierdere sau redundanță; 2). Un cromozom translocat și unul netranslocat pot merge la fiecare pol. Dacă cei doi centromeri la fiecare pol sunt diferiți (disjunctiv – unul „alb“ și altul „negru“), distribuția lor este adiacentă-1; 3) Cromozomii translocați și netranslocați care merg spre același pol au centromeri omologi (nondisjuncție: fie 2 „negri“, fie 2 „albi“, separarea este adiacentă-2). Distribuțiile adiacent-1 și adiacent-2, oricât de mic ar fi segmentul translocat produc gameți neviabili sau zigoți neviabili. În dreapta o configurație cruciformă de împerechere la insecta *Sciara coprophila*, în celulele glandelor salivare, heterozigote pentru o translocație între cromozomii III și IV (după Helen Crouse, din Rédei, 1986)

de o mare diversitate și se descoperă frecvent noi compuși chimici cu asemenea proprietăți nedorite. Bunăoară, izomerul gamma al hexaclorciclohexanului (γ–HCH) reprezintă substanța activă din insecticidul Lindan și din medicamentul administrat ca unguent în combaterea râiei. Gavrilă (1978, 1980) a descoperit că o asemenea substanță are mai întâi efect statmokinetic și, decurgând din acesta, este indusă mutația genomică, cu realizarea de grade înalte de multiplicare a genomului (hiperploidii) cu consecințe clastogene foarte evidente (fig.12).

În figura 13 se reprezintă grafic consecințele ruperii cromozomale sub acțiunea diferiților agenți mutageni și modul în care apar remanierile (restructurări) cromozomale la organismele eucariote.

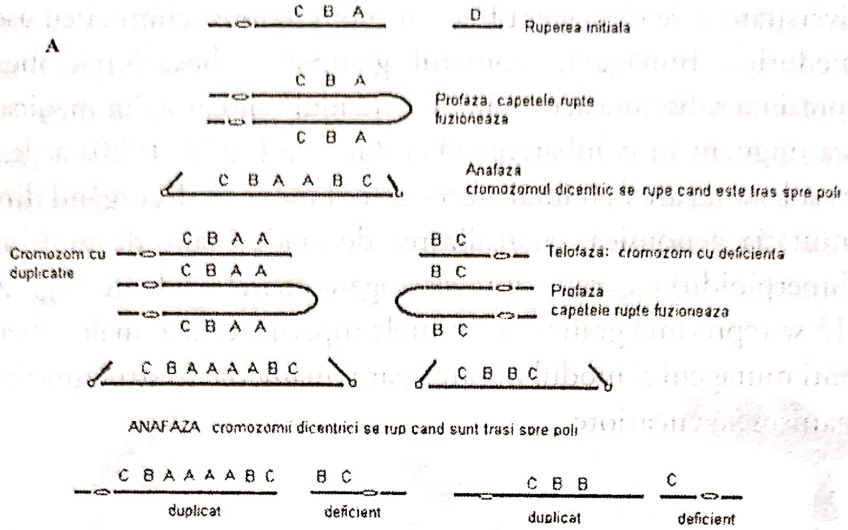
4. CONSECINȚELE BIOLOGICE ALE MUTAȚIILOR GENICE

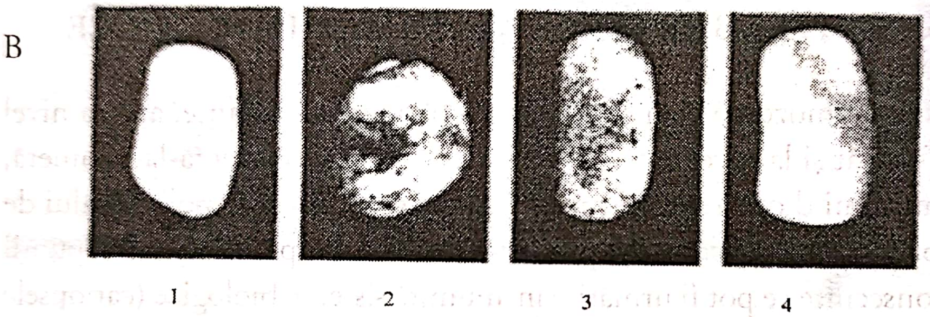
Translocațiile cromozomale au consecințe biologice importante, atât la nivel citologic (fig.14), cât și la nivel fenotipic. Fuziunile de tip telomeră-la-telomeră, generează cromozomi dicentrici care, atunci când sunt trași spre polii fusului de diviziune dau punți anafazice care se rup. Există un ciclu al ruperii-fuziunii și punții cromatice cu consecințe ce pot fi urmărite în anumite sisteme biologice (cariopsele de porumb, în exprimarea lor fenotipică variabilă (fig. 15).

Dacă la unele plante, precum cele din genurile *Oenothera* și *Rheo*, translocațiile au jucat un rol major în asigurarea heterozigoției permanente și a heterozisului care a crescut gradul de fitness, la animale, și în special, la om, translocațiile (fig. 16) au efecte extrem de nocive ca și delețiile sau duplicațiile (fig. 17 și 18) Delețiile cromozomale pot fi actualmente vizualizate la nivelul ADN, prin diferite metode de investigație biochimice, dar și direct, prin analiza electronomicroscopiei a macromoleculelor ADN, sau a cromozomilor mitotici și a cromozomilor politeni (fig. 19).

Cromozomii meiotici oferă, prin sinapsa lor meiotică, asemănător cromozomilor politeni, posibilități mari de detecție a restructurărilor de tipul inversiei sau al deleției/deficienței (fig. 19). Inversiile în cadrul brațului cromozomal (paracentrică), sau care cuprinde și porțiunea centromerică (pericentrică), sunt ușor identificate în meioză și mai ales în cromozomii politeni (fig. 20).

Clivarea aberantă (transversală) a centromerului conduce la geneza de izocromozomi (fig. 21), dacă în următorul ciclu de replicare are loc replicarea de sine stătătoare a fiecăruia dintre asemenea brațe cromozomale. Asemenea izocromozomi sunt generați după o secvență de evenimente redată în figura 23.


A
C B A
D
Ruperea initiala
C B A
Profaza, capetele rupte fuzioneaza
C B A
Anafaza
cromozomul dicentric se rupe cand este tras spre poli
C B A A B C
Cromozom cu duplicatie
C B A A
C B A A
C B A A
B C
Telofaza: cromozom cu deficienta
B C
Profaza
capetele rupte fuzioneaza
B C
C B A A A A B C
C B B C
ANAFAZA cromozomii dicentrici se rup cand sunt trasi spre poli
C B A A A A B C
duplicat
B C
deficient
C B B
duplicat
C
deficient



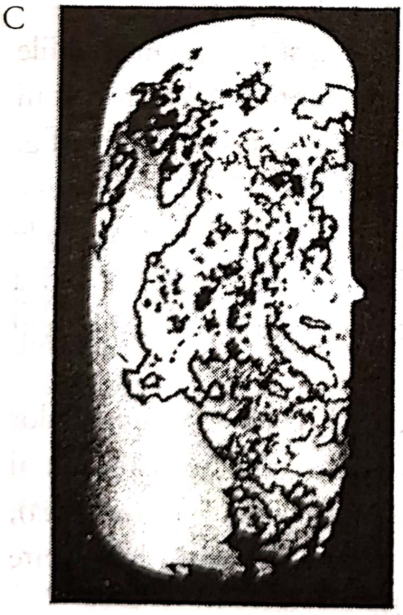


Fig. 15. A. — Ciclurile rupere-fuziune-punte. Din motive de simplificare se prezintă doar unul dintre cromozomii unei perechi și anume cel afectat de rearanjament (din McClintock, 1941).
B. Cariopse de porumb în care se manifestă consecințele genetice ale ruperii-fuziunii-punții. Boabele din poziția 1 prezintă genele *I* și *Bz* în cromozomi normali. Gena *I* este o genă dominantă, inhibitoare a sintezei pigmentului. Alela *bz* transformă culoarea bronz în aleuronă. Oricând este prezentă *I*, bobul este necolorat. Când *I* este pierdut dintr-o celulă sau dintr-un grup de celule, genele determinatoare ale culorii se pot exprima. Dacă *I* este pierdut de timpuriu, în cursul procesului de diferențiere a aleuronei zonele colorate sunt întinse (bobul 2). Pierderea mai târzie a alelei *I* se asociază cu apariția a numeroase pete mici de culoare (bobul 3 și bobul 4) (din B. McClintock, 1951).
C. Mozaic de culori (variegare) pe o cariopsă de porumb, produs ca urmare a acțiunii elementelor genetice mobile (după McClintock, 1951).

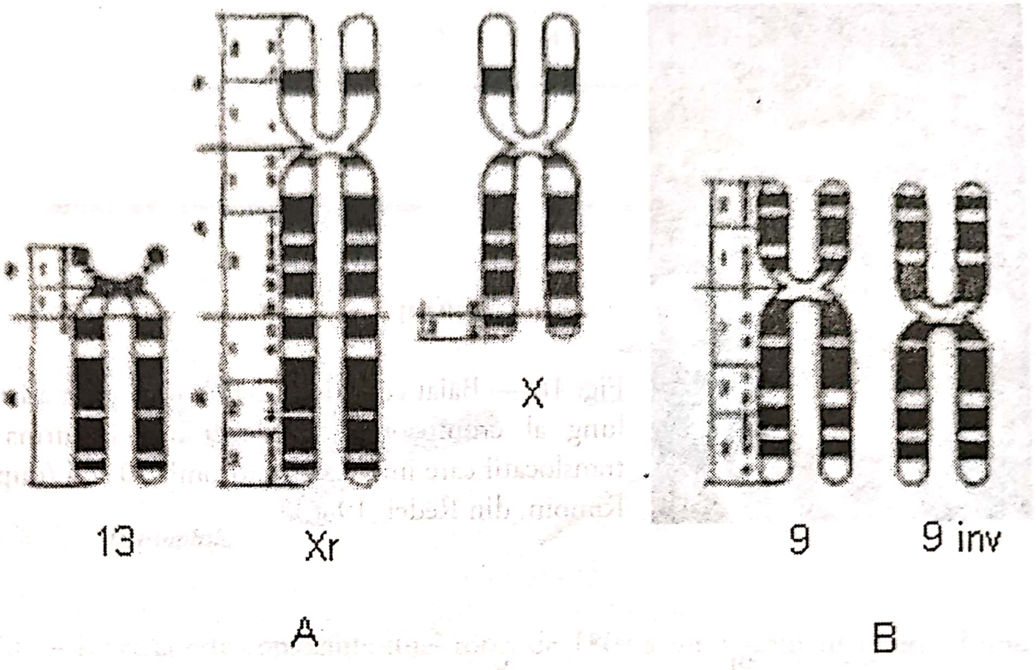

13
Xr
X
9
9 inv
A
B

Fig. 16 — Translocația (centru) dintre cromozomul uman X (dreapta) și cromozomul uman 13 (stânga). Cromozomii au fost colorați prin tehnica de bandare și diagramați după metodele convenționale (din Crandall și colab., 1974).
B Cromozomul uman 9 (stânga) și același cromozom care a suferit o inversie pericentrică (din A.O de a Chapelle și colab., 1974).

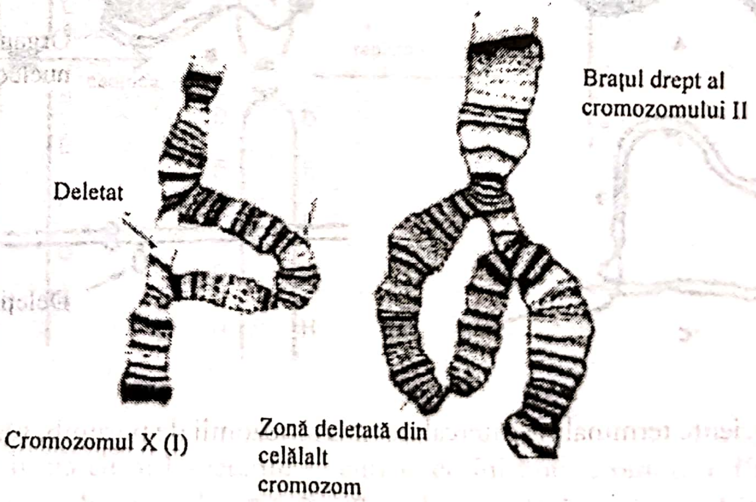

Brațul drept al cromozomului II
Deletat
Cromozomul X (I)
Zonă deletată din celălalt cromozom

Fig. 17 — Dovada citologică pentru deleția din cromozomii politeni de *Drosophila*. Sunt redate doar unele porțiuni din cromozomii X și 2. A se nota bucla caracteristică (din T.S. Painter, 1934).

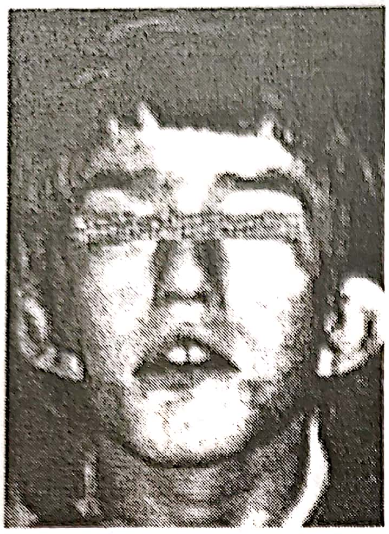


Fig. 18 — Băiat cu o duplicație a unei părți a brațului lung al cromozomului 4, rezultată în urma unei translocații care implică cromozomii 20 și 4 (după Dr. Rimoin, din Rédei, 1986).

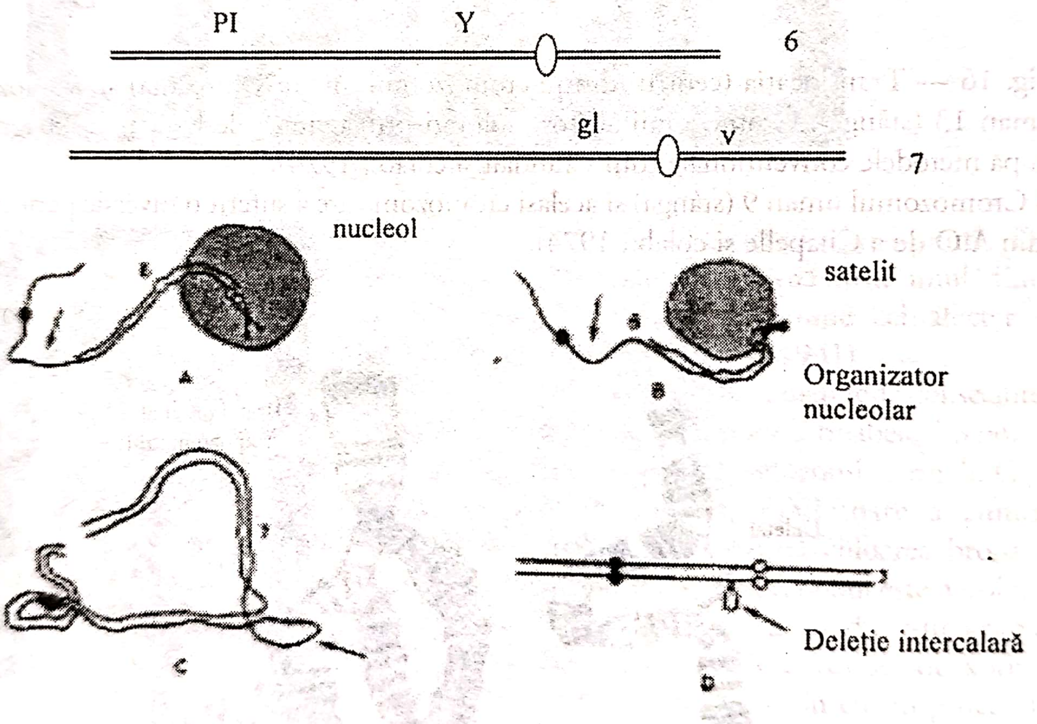

PI
Y
6
gl
v
7
nucleol
satelit
Organizator nucleolar
A
B
C
D
Deleție intercalară

Fig. 19 — deficiențe terminale și intercalare în cromozomii de porumb, văzute în stadiul de pachiten.
Sus: porțiuni din harta genetică a cromozomilor 6 și 7
Jos (A,B): deficiențe ale cromozomului 6
C: buclarea cromozomului normal la nivelul regiunii deleției interne a cromozomului 7
D: desen de interpretare a deleției văzută în camera lucidă.
(după B. Mc Clintock, 1931).

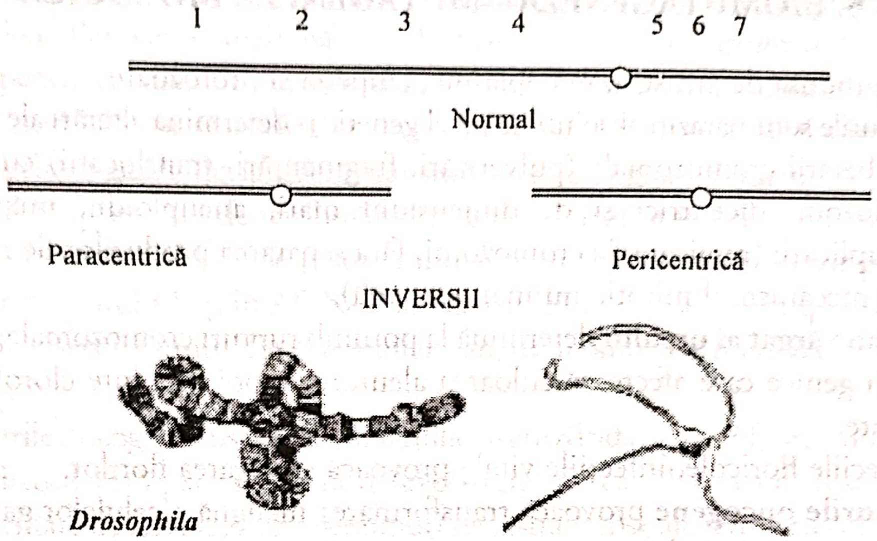

1
2
3
4
5 6 7
Normal
Paracentrică
Pericentrică
INVERSII
Drosophila

Fig. 20 — Inversia este consecința unei rotiri de 180° a unui segment intern al unui cromozom.
Jos: bucla de inversie în cromozomii politeni la *Drosophila* (din T.S Painter, 1934) și în cromozomi meiotici de porumb (din B. Mc Clintock, 1931).

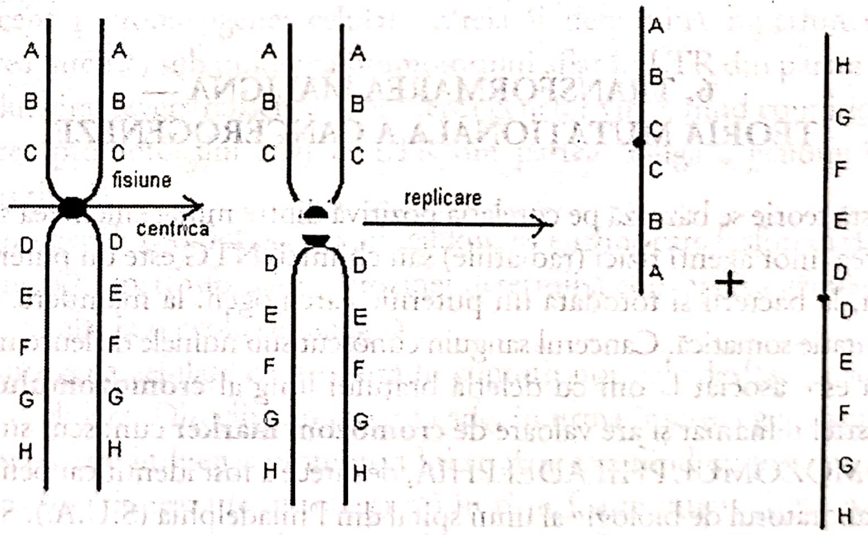

A
B
C
fisiune
centrica
D
E
F
G
H
replicare
+

Fig. 21 — În urma clivării aberante a centromerului unui cromozom (în acest caz un submetacentric)rezultă două brațe cromozomale care după replicare devin cromozomi metacentrici, unul mai scurt, altul mai lung. Acești cromozomi derivați sunt izocromozomi, deoarece brațele lor reprezintă imaginea în oglindă, ca informație ereditară a unuia, pentru celălalt, oglinda fiind centromerul, fiecare cromozom având în cele două brațe ale sale aceleași gene, dispuse însă într-o ordine inversată (original).

5. BIOMUTAGENEZA—MUTAGENEZĂ BIOLOGICĂ

Este produsă de virusuri, micoplasme, ciuperci și protozoare

Virusurile sunt paraziți absoluți de nivel genetic și determină alterări ale expresiei genice, aberații cromozomale (pulverizări, fragmentări, translocații) cu apariția de cromozomi dicentrici și de dimensiuni mari, aneuploidii, mixoploidii, endoreduplicații (replicare de cromozomi, fără separarea produșilor de replicare, deoarece mecanismul mitotic nu mai operează).

Virusul vărgat al orzului determină la porumb rupturi cromozomale, precum și mutații genice care afectează culoarea aleuronei, apoi mutante clorofiliene și viviparitate.

La speciile floricole, infecțiile virale provoacă variegarea florilor.

Virusurile oncogene provoacă transformarea malignă a celulelor gazdă prin inserția genomului viral în cromozomii acestora.

Infecțiile virale provoacă leziuni în materialul genetic, determinând creșterea frecvenței aberațiilor cromozomale în culturi de celule umane, aneuploidii, poliploidii, rupturi cromozomale (fragmentări), dicentrici, inelari și numeroase tipuri de translocații. **Virusul rubeolei** provoacă la persoanele bolnave o incidență mare a rupturilor cromozomale în leucocite.

6. TRANSFORMAREA MALIGNĂ — TEORIA MUTAȚIONALĂ A CANCEROGENEZEI

Această teorie se bazează pe corelația pozitivă dintre mutagenicitatea și carcinogenicitatea unor agenți fizici (radiațiile) sau chimici. NTG este un puternic agent mutagen, la bacterii si totodată un puternic carcinogen, la mamifere. Cancerul este o mutație somatică. Cancerul sanguin cunoscut sub numele de leucemie cronică mieloidă este asociat la om cu deleția brațului lung al **cromozomului 22** care devine astfel remaniat și are valoare de **cromozom marker** cunoscut sub numele de CROMOZOMUL PHILADELPHIA, deoarece a fost identificat pentru prima dată în laboratorul de biologie al unui spital din Philadelphia (S.U.A.). Segmentul desprins din cromozomul 22 este translocat pe cromozomul 9 și viceversa, segmentul cromozomal din cromozomul 9 este translocat pe brațul lung și rupt al cromozomului 22 care devine astfel cromozom 22 modificat — cromozomul Philadelphia *(Ph1)* și care este totuși mai mic decât cromozomul 22 anormal.

Cancerul de sân prezintă numeroase linii celulare, în fiecare apărând un interschimb între cromozomul 1 uman și oricare dintre ceilalți cromozomi ai complementului.

Malignizarea are la bază o mutație recesivă, fapt dovedit de comportamentul hibridului celular, celulă malignă — celulă normală ce s-a comportat ce și celula normală, pentru ca, ulterior, prin pierdere de cromozomi aportați în hibridul celular de celula normală, să se revină la starea malignă. Integrarea unui provirus în genomul celulei gazdă declanșează transformarea malignă a celulei.

Virusul SV_{40} este un deoxiribovirus care se multiplică în celulele maimuțelor din ordinul Simieni. El nu se poate multiplica în celulele umane, dar pătrunde în ele, imortalizându-le și în ADN-ul lor identificându-se secvențe specifice SV_{40} integrate în diferite situsuri din genomul uman, unul dintre ele fiind în cromozomul 7 uman.

Virusurile oncogene ARN aparțin familiei Retroviridae: virusul sarcomului Rous (VSR), virusul HIV_1 și HIV_2. Prin reverstranscrierea ARN viral, rezultă copii complementare de ADN. Aceste genomuri reverstranscrise ale retrovirusurilor induc în starea lor integrată transformarea malignă a celulei gazdă, condiționând apariția leucemiilor și a tumorilor maligne solide. Sub forma sa integrată (provirus), genomul tuturor retrovirusurilor are lungi repetiții terminale (LTR) directe și repetiții scurte inversate la capete, iar integrarea sa creează scurte repetiții directe în genomul gazdă, la situsul de integrare.

Transformarea malignă este declanșată de integrarea provirusului într-un situs aflat adiacent protooncogenei celulare căreia îi determină hiperfuncționarea (transcrierea intensă) sub influența promotorului aflat în LTR din partea dreaptă a genomului viral reverstranscris, transcrierea genelor virale fiind condiționată de funcționarea promotorului aflat în LTR din partea stângă a genomului viral reverstranscris.

Protooncogenele codifică pentru proteinkinaze, enzime care fosforilează tirozina din proteine. O hiperfosforilare a tirozinei determină convertirea celulei de la o evoluție normală, la o evoluție malignă.

Protooncogena celulară controlează în condiții normale desfășurarea corectă a diviziunii celulare. Din clipa în care ea cade, în urma inserției genomului viral reverstranscris, sub influența promotorului viral, acesta fiind un promotor foarte puternic, ea funcționează (este transcrisă) în ritm foarte intens și nu mai poate asigura controlul diviziunii celulare și celula se divide anarhic.

Multe retrovirusuri au încorporat în genomul lor, în decursul infecțiilor trecute, protooncogena și aceasta rămâne astfel permanent sub controlul puternicului promotor viral suferind unele modificări de secvență și devenind de acum o oncogenă virală. La integrarea genomului reverstranscris al virusului oncogen în genomul celulei gazdă o asemenea oncogenă virală reverstranscrisă va determina transformarea malignă a celulei, cu mult mai multă eficiență.

Integrarea provirusului oncogen declanșează în multe cazuri rearanjamente cromozomale, făcând ca protooncogena normală, a genomului celular, să vină în vecinătăți genice noi care favorizează funcționarea sa la nivele cantitative ce condiționează malignizarea celulară. Alteori, agenții mutageni afectează secvența promotorului protooncogenei normale, devenind agenți carcinogeni, determinând, pe lângă diferite mutații și transformarea malignă a celulei.

În cazul virusului sarcomului Rous (VSR) ce provoacă sarcom la găini, protooncogena (oncogena celulei gazdă) codifică pentru o proteinkinază ce are o greutate moleculară de 60.000 daltoni și determină în condiții normale fosforilarea resturilor tirozină, exprimându-se în anumite etape ale dezvoltării și diferențierii normale. In condițiile infecției cu VSR are loc o intensificare foarte mare a nivelului fosforilării tirozinei, ceea ce stă la baza direcționării celulei gazdă pe calea transformării maligne. Copia oncogenei celulare devenită oncogenă virală, în ipostaza sa nouă, reverstranscrisă și integrată în ADN nuclear al celulei gazdă determinând nivele cantitative și ridicate ale fosforilării resturilor Tirozină in proteinele celulei gazdă, ceea ce conduce la instalarea ireversibilă a transformării maligne a acestei celule, este intens transcrisă, apoi tradusă, ceea ce determină acumularea în celulă a unor mari cantități de proteinkinază desemnată pp 60 src.

Alte oncogene înrudite condiționează sinteza unor proteinkinaze ce fosforilează alți aminoacizi (treonina, serina, sau histidina). Tirozinkinaza stimulează multiplicarea celulară. Poliferarea celulară anarhică apare atunci când nivelul tirozinazei depășește un anumit prag. Este clar că TRANSFORMAREA MALIGNĂ ESTE UN PROCES CARE ARE UN PREPONDERENT DETERMINISM CANTITATIV, UN PROCES CU MODULARE CANTITATIVĂ.

Alte oncogene celulare normale controlează procese biologice ale dezvoltării. Astfel, **oncogena c-Fos** este în mod normal exprimată în procesele de osteogeneză și atunci când este funcțională la parametri cantitativi ridicați, condiționează apariția de osteosarcoame.

Pe această cale, din gene menite să asigure controlul diviziunii celulare, în condițiile infecției cu virusuri oncogene retrovirale sau în condiții de mutagenicitate, protooncogenele devin „gene nemuritoare", determinând transformarea malignă a celulelor, cu proliferare nelimitată, anarhică; ele ar putea fi „nemuritoare" dacă ar evolua în condiții în care nu ar distruge prin creșterea masei tumorii rezultate, țesuturile învecinate. „Nemuritoarele" însă ucid organismul gazdă murind odată cu el.

În cazul limfomului Burkitt, transformarea malignă este însoțită de o translocație între cromozomul 8 și cromozomul 14. Celulele transformate malign sunt în acest caz limfocitele producătoare de imunoglobuline. In condiții normale, sinteza de imunoglobuline presupune un fel de cooperare genică între genele pentru regiunea variabilă a catenei imunoglobulinice și genele pentru regiunea constantă a acestei catene. Aceste gene sunt localizate în cromozomii 2, 14 și 22 din complementul uman. Contiguitatea acestor gene se realizează în condiții normale, prin remanieri cromozomale, de tipul delețiilor și transpozițiilor. Dacă însă translocația se realizează între oricare dintre acești trei cromozomi și cromozomul 8, apare transformarea malignă a limfocitelor, caracteristică sindromului Burkitt, deoarece va fi super activată, în urma unei asemenea translocații anormale, protooncogena ce ocupă o poziție strategică la punctul de rupere din cromozomul 8, acolo unde fragmentul translocat al cromozomului 8 este atașat la cromozomul 14, devenind lincată cu genele pentru imunoglobuline, aflate în acest cromozom. Aceste gene vor fi transcrise intens: se produce o mare cantitate de imunoglobuline, numai că acestea sunt ineficiente în apărarea organismului. Tehnicile moleculare moderne permit identificarea prin electroforeză a rearanjamentului cromozomal 8/14, la nivel molecular, așa cum rezultă din figura 26.

7. MUTAGENEZA INSERȚIONALĂ

În ultimii 20 de ani s-au adus numeroase date referitoare la existența și proprietățile elementelor genetice mobile, descrise pentru prima dată de către Barbara McClintock, la porumb, cunoscute ca elemente de instabilitate genică, care modifică expresia genică, activând sau inactivând genele dispuse în cromozom, la nivelul situsului de inserție a elementului genetic mobil.

La bacterii, elementule genetice mobile au fost descrise sub numele de secvențe de inserție (IS) sau „gene săritoare", după descoperirea de către Starlinger a unei categorii speciale de mutații ce apar la nivelul diferitelor gene din operonii bacteriei *E.coli*, numite **mutații polare**. Specificul acestor mutații este caracterul lor polarizat, în sensul că dacă o asemenea mutație apare într-un anumit situs din operon, ea afectează toate genele care sunt dispuse în aval, adică după acest situs de inserție. Tehnicile de hibridare moleculară dintre ADN de la tipul sălbatic de bacterie și de la tipul mutant, cu mutații polare, au permis evidențierea, după renaturare, a unor bucle monocatenare care nu realizau împerecherea și astfel s-a dedus că aceste bucle reprezintă elemente de inserție, desemnate IS. Au fost descrise mai multe tipuri de IS: $IS_{I,}$ IS_{II}, IS_{III}, IS_{IV}. Aceste elemente genetice mobile există la un anumit moment integrate într-un plasmid, pentru ca apoi să sufere desinserția și să treacă într-un alt plasmid sau în cromozomul bacterian, de aici într-un alt plasmid etc. Inserția, dezinserția și mobilizarea de la un cromozom la altul a acestor elemente se realizează prin intervenția unui sistem enzimatic numit **transpozază.** Cel mai bine înțeles este procesul inserției (reducție) și dezinserției (inducție) profagului lambda (λ) al bacteriei *Escherichia coli*, pentru care s-a elaborat modelul Campbell potrivit căruia există secvențe cu omologie atât în ADN bacterian cât și în ADN lambda, numite puncte de atașare **att λ** sau **att B**, respectiv **attP**. La nivelul acestor puncte de atașare se realizează recombinarea genetică prin crossing-over în urma căruia, din forma circulară a ADN lambda (circularizare realizată datorită prezenței cozilor sau prelungirilor monocatenare de la capetele moleculei bicatenare numite capete coheziive, adezive sau „ lipicioase“) care sunt monocatenare și complementare trece în forma liniară prin integrarea sa în cromozomul circular bacterian. Inserția ca și dezinserția ADN lambda se realizează prin intervenția concertantă a două sisteme enzimatice: **integraza** și **excizionaza** a căror sinteză este dirijată de către genele **int** și **xis**.

Un segment de inserție care la dezinserție preia din cromozomul sau plasmidul bacterian o genă, devine un transpozon. Acesta are în secvența sa de nucleotide gena respectivă care poate fi o genă de rezistență la antibiotice, o genă pentru transpozază și o genă pentru β-lactamază. La *E. coli* s-a demonstrat rolul inserției transpozomului **Tn 9** în mutageneza genei **gal**.

Bacteriofagul Mu al bacteriei E. coli are valoarea unui agent mutator, inducând mutația celor mai diverse gene, deoarece el se poate inserționa ca profag în orice situs din cromozomul bacterian, determinând și fenomenul de transducție generalizată.

Asemenea elemente genetice mobile au fost identificate ulterior și la organismele eucariote. Astfel, la *Saccharomyces cerevisia*e s-a identificat elementul genetic mobil desemnat ADN 2μm, iar la *Drosophila melanogaster,* elementul **copia**.

In anul 1990, japonezul Kenji Sakaguchi a introdus termenul de **invertoni,** spre a desemna o clasă de elemente genetice înrudite funcțional, în care se includ plasmide cu ADN linear, elemente transpozabile și genomurilor de tip Adenovirus.

Plasmidele cu ADN linear care au secvențe identice în orientare inversată la terminali (la capete) au fost identificate în celulele polinice de porumb, la specii de *Streptomyces,* la drojdii și la ciuperci. Această structură a ADN se întâlnește și la adenovirusuri, la fagul φ 29 al bacteriei *Bacillus subtilis* precum și la diferitele elemente transpozabile cum sunt **Ac, Ds** și **Spm** de la porumb, elementele **Tam** de la *Antirrhinum majus,* elementele **P** de la *Drosophila,* și transpozonii de la *Escherichia coli* și alte bacterii.

Replicarea acestor elemente ADN începe invariabil de la proteinele terminale legate covalent la capetele lor 5'. La adenovirusuri și fagul **φ 29** s-a dovedit că ADN-polimeraza, proteinele terminale și factorii de elongație a ADN sunt codificați în genomul viral. Adenovirusurile și plasmidele lineare **S-1** și **S-2,** din grăuncioarele de polen, de la porumb, sunt integrate în și excizate din ADN cromozomal sau mitocondrial ca elemente genetice mobile. S-a stabilit că există similitudine între genele pentru ADN polimerază ce intervine în replicarea acestor plasmide lineare ADN, diferite virusuri animale și bacteriofagi.

Genele pentru ADN polimeraza din plasmidele lineare ADN, de la drojdie și porumb, desemnate pGKL1, pGKL2 și S-1 ca și din ADN al fagului φ 29 de *B. subtilis*, fagii PRDI și T_4 de *E.coli*, de la adenovirusul tip 2, **virusul vaccinia, virusul Epstein-Barr** aparțin familiei de secvențe genice pentru ADN polimerază B ce posedă trei segmente consens 1, 2 și 3 care sunt caracteristice acestei familii de polimeraze. Aceste elemente ADN care prezintă similitudini structurale și funcționale pot fi considerate ca un grup coerent de elemente genetice care poartă numele generic de INVERTONI. Pentru a explica aceste particularități structurale și funcționale ale invertonilor s-a propus modelul „cadru — rachetă“ de către Sakaguchi. Acest tip de elemente genetice mobile este distinct de retrovirusuri și elementele transpozabile de tip retro, precum **Ty1**, la *Saccharomyces cerevisiae* care are repetiții terminale directe lungi, sunt omoloage genei reverstranscriptazei retrovirusurilor, având un intermediar ARN pentru replicare.

La *Streptomyces rochei*, Sakaguchi (1990) a descris două plasmide ADN lineare de 17 kb și pe care le-a desemnat pSLA1și pSLA2, bacteria produce un antibiotic numit lankacidină. Aceste două plasmide sunt aproape identice în secvența ADN judecând după hibridizare, pSLA1 fiind cu 500 baze mai scurtă decât pSLA2. La fiecare terminal 5’ al acestui ADN este atașată covalent o proteină terminală care probabil servește pentru inițierea replicării ADN. Capetele 3’ sunt libere, fiind degradabile, sub acțiunea exonucleazei 3’. Aceste proprietăți sunt foarte similare celor de la ADN de adenovirus și ADN al fagului φ 29, al bacteriei *B. subtilis*. ADN de pSLA2 are secvențe complet identice, la ambele capete (din nou similar cu virusurile de tip adeno) pentru 614 perechi de baze, urmate de 11 boxuri de repetiții întrerupte și inversate, ce se extind până la 800 perechi de baze, din ambele capete. Aceasta s-a numit regiunea omoloagă întreruptă.

La diferite tulpini producătoare de antibiotice de *Streptomyces* s-au putut identifica o serie de plasmide ADN lineare foarte mari, de la 180 la 590 kilobaze, genele ce controlează producerea de antibiotice fiind plasate în aceste plasmide. Dintre acestea, plasmidul SCP1 are 350 de kb și prezintă repetiții inversate, de mai mult de 70 kb, la ambele capete, aceste două capete fiind atașate de o proteină. SCP1 este uneori integrat în cromozomul de *S. coelicolor* și chiar și în această situație produce antibioticul metilenomycina A. Aceste particularități justifică încadrarea plasmidelor lineare gigantice de *Streptomyces* sp. în familia invertoni, considerând structura ADN a lor și funcțiile genetice.

La drojdia *Kluyveromyces lactis* s-au identificat două tipuri de plasmide ADN lineare, pGKL1 și pGKL2 de 8.874 și 13.457 perechi de baze lungime, cu repetiții terminale inversate de 202 și, respectiv, 184 perechi de baze. Plasmidul mai lung, pGKL2 este responsabil de replicarea și menținerea ambelor plasmide. Aceste plasmide sunt compatibile cu mitocondriile de *S.cerevisiae*; aici ele nu se pot replica în prezența mitocondriilor, dar în *K. lactis* ele pot să se replice.

Plasmidul mai scurt, pGKL1, produce o toxină proteinică care omoară celulele de *S.cerevisiae*, *Candida utilis, C. tropicalis, Hansenula anomala, Kluyveromyces fragilis și K.lactis* care sunt lipsite de aceste plasmide.

Secvența de 8.874 perechi de baze a pGKL1 are patru cadre deschise citirii (ORF), cel de al doilea ORF și cel din extrema stângă codificând pentru trei subunități ale proteinei-toxină. Singurul ORF transcris în direcție opusă codifică pentru proteina imunității. Proteina-toxină acționează pe preparatele membranare de *S.cerevisiae*, in vitro, și blochează sinteza AMP ciclic. ORF din extrema dreaptă codifică pentru ADN polimeraze din familia B, întâlnite și la fagii PRD și φ 29, plasmidul S-1, adenovirus și alte virusuri animale.

Plasmidul mai lung pGKL2 are 13.457 pb și 10 ORF-uri. ORF_2 are trei segmente consens cu ADN polimerazele B, iar ORF_6 are omologie cu ARN polimerazele. Un plasmid linear ADN cu același caracter desemnat pSKL a fost descris la *Saccharomyces kluyveri* având 14,2 kb și prezentând secvențe terminale inversate, identice, de 483 pb, la ambele capete. La capătul său 5' se leagă covalent proteine terminale mari. In cadrul secvențelor terminale, repetate, se află 8 secvențe repetate în tandem, de câte 30 pb: AAGAGAAGGGGATATTGGTAGAGTGTATCGTG, ceea ce înseamnă că aceste secvențe terminale repetate ale acestor plasmide iau naștere printr-un proces de alunecare (**slippage**) în cursul sintezei ADN.

Plasmidul pSKL a fost secvențiat de către Hiron și Hishinuma (1990) și s-a constatat asemănarea cu pGKL 2, având ORF-uri cu lungimi similare și orientări identice cu cele de la pGKL2, prezentând o omologie de secvență de 55%.

Identitatea completă a secvențelor terminale ale tuturor plasmidelor lineare ADN și adenovirusurilor sugerează că acestea au apărut prin evenimente de recombinare, în cursul proceselor evolutive de formare a acestor lungi repetiții terminale. Evenimentul de recombinare apare doar între două molecule bicatenare de ADN, cu o secvență identică sau asemănătoare și care s-au juxtapus strâns, formând un aliniament paralel de două duble catene.

Tipuri similare de plasmide au fost descrise de către Levings și colaboratorii în celulele polinice sterile de la porumb și care se excizează din și se inseră în ADN mitocondrial, în mod reversibil, asemănător elementelor genetice mobile și adenovirusurilor. Ele au secvențe terminale identic inversate, de 208bp, la ambele capete. La terminalul 5' se leagă covalent proteine terminale. ADN al plasmidului S-2 a fost complet secvențiat, având 5.452 pb, cu un ORF necaracterizat și un ORF care are trei segmente consens ale ADN polimerazelor din familia B.

Plasmide similare ADN au fost identificate la ciupercile *Ascobolus immersus, Claviceps purpurea, Rhizoctonia solani, Morchella conica, Pleurotus ostreatus* și *Lentinula edodei*, precum și la plantele *Sorghum bicolor, Brassica campestris* și *B.nappus*. Toate aceste plasmide prezintă două caracteristici comune: repetițiile terminale inversate de ADN și prezența proteinelor terminale legate covalent la capetele 5'. Ele au o altă proprietate caracteristică și anume numărul neobișnuit de mare de copii, în citoplasma gazdă.

In cazul adenovirusurilor, ADN viral are repetiții terminale inversate, identice, de circa 100 pb lungime. La capetele 5' ale ADN de adenovirusuri se leagă covalent proteine de 55 kd. Genomul viral codifică pentru aceste proteine reprezentate de proteina terminală propriu-zisă, topoizomeraza, ADN polimeraza din familia B, proteina de legare la ADN și altele. Replicarea ADN începe de la proteina precursoare terminală, de 80 kd care se atașează la terminalul ADN linear, recunoscând un situs de 10 baze din ADN, situat foarte aproape de capăt. Microscopia electronică a arătat că ADN nou sintetizat, legat covalent, începe la precursorul terminal proteinic și se alungește spre celălalt terminal. Alt trei proteine cu origine în celula gazdă și anume: factorul nuclear 1 și proteinele A și C de legare specifică la origine, se leagă în mod specific la fiecare din cele trei domenii terminale, domeniul A (nucleotidele 1 la 18) și domeniul B (nucleotidele 19 la 40, din ambele capete). Atașarea acestor proteine de legare la ADN de origine celulară, crește eficiența replicării ADN viral de mai mult de 30 de ori. Proteinele terminale și proteinele de legare se pot lega una de alta, prin capetele moleculelor lor.

Când aceste virusuri infectează celulele animale, ADN-ul lor poate fi uneori integrat în și apoi excizat din ADN cromozomal gazdă, la situsuri nespecifice de manieră asemănătoare plasmidelor lineare de la porumb și elementelor genetice transpozabile. Capetele ADN viral vin de se împreunează și se inseră astfel în diferite situsuri din ADN celular, fără a fi secvență comună între ADN gazdă și ADN viral, formându-se o structură asemănătoare unei rachete de tenis, model propus de Sakaguchi (1990).

Recunoașterea situsurilor de integrare are loc prin interacții proteină-ADN.

In unele linii celulare transformate, ADN viral a fost complet excizat și eliminat din genomul gazdă, dar aceste celule păstrează în continuare fenotipul transformat când sunt injectate în hamsteri, probabil prin mecanismele declanșate anterior, care au determinat transformarea oncogenică.

Proprietăți asemănătoare au fost evidențiate la virusul φ 29 de *B. subtilis* cu ADN linear și proteine terminale legate covalent la terminalul 5'. Această proteină terminală se leagă la ADN polimeraza și îi menține transfectivitatea și capacitatea de replicare a genomului fagic. ADN are repetiții terminale inversate de 6 pb și 7 regiuni întrerupte omoloage inversate, compuse din secvențe de 2 până la 6 pb. ADN viral codifică pentru proteina terminală, ADN polimeraza familia B, factorul de elongație ADN și alte proteine. Proteina terminală se atașează la terminalul ADN, prin recunoașterea a 10 baze terminale. Replicarea ADN este inițiată și alungită din proteina terminală. Proteinele terminale au proprietatea coeziunii reciproce.

Elementele transpozabile sunt și ele membre ale grupului invertonilor.

Multe elemente genetice mobile și transpozoni prezintă structura genetică și funcția de bază pe care o au și virusurile de tip adeno și plasmidele lineare. Aceste elemente posedă repetiții identice terminale, inversate, adesea urmate de regiuni de omologie, întrerupte cu orientare inversată, la cele două capete.

Mulți transpozoni de *E.coli* au repetiții terminale inversate de circa 40 pb. Elementele genetice mobile de la porumb *Ac* și *Ds* au o secvență terminală comună de 11 pb și 4 regiuni omoloage întrerupte la capete. Elementul mobil de la porumb desemnat **Spm** are repetiții terminale inversate de 13 pb cu patru regiuni omoloage întrerupte.

Elementul mobil **Tam 1** de la *Antirrhinum majus* este doar unul din multele, identificate ca factori ce determină instabilitatea culorii florilor și sintetazei chalconice, la această plantă ornamentală. *Antirrhinum majus* este una dintre plantele cele mai studiate privitor la mutageneza spontană și indusă care afectează culoarea și forma florilor (fig. 22) **Tam 1**, **Tam 2** și **Tam 3** au secvențe terminale inversate de 13 pb care sunt aproape identice cu cele de la **Spm** și prezintă, de asemenea, trei regiuni omoloage întrerupte.

La soia, în gena pentru lectină, Vodkin și colab. (1983) au identificat două elemente genetice mobile **Le 1** și **Le 2**. Ele au secvențe terminale inversate, urmate de o regiune omoloagă întreruptă, alcătuită dintr-o secvență de 17pb.

Un grup de elemente transpozabile cu repetiții terminale inversate a fost identificat într-o linie celulară de *Drosophila melanogaster* și a fost desemnat grupul elementelor P. Un element P secvențiat s-a constatat a avea 2.906 pb lungime cu repetiții terminale perfect inversate de 31 pb și patru ORF-uri de 297, 714, 792și 655 pb. Aceste elemente P pot fi inserate în diferite „pete fierbinți" din ADN cromozomal al insectei și pot apoi să fi excizate cu restabilirea secvenței originale a ADN cromozomal. Aceste elemente constituie vectori genetici utili pentru analizele moleculare la *Drosophila*, în diferite linii celulare, în embrioni de *Drosophila* și alte organisme.

La ariciul de mare *Strongylocentrotus purpuratus*, într-o pseudogenă a histonei H_2B s-a găsit un element transpozabil de 3 kb, desemnat **TU1** care are repetiții terminale perfecte, o lungime de 840 pb și e flancat de repetiții directe de câte 8 pb ale genei H_2B.

Deoarece nu s-au putut niciodată izola forme libere ale acestor elemente genetice mobile nu se știe nimic despre posibila prezență a proteinelor terminale.

În cadrul genomurilor diferitelor elemente transpozabile, nu au fost detectate gene pentru ADN polimeraze. Aceasta sugerează că asemenea elemente genetice mobile, nu se multiplică riguros în citoplasmă. Nu s-a constatat existența

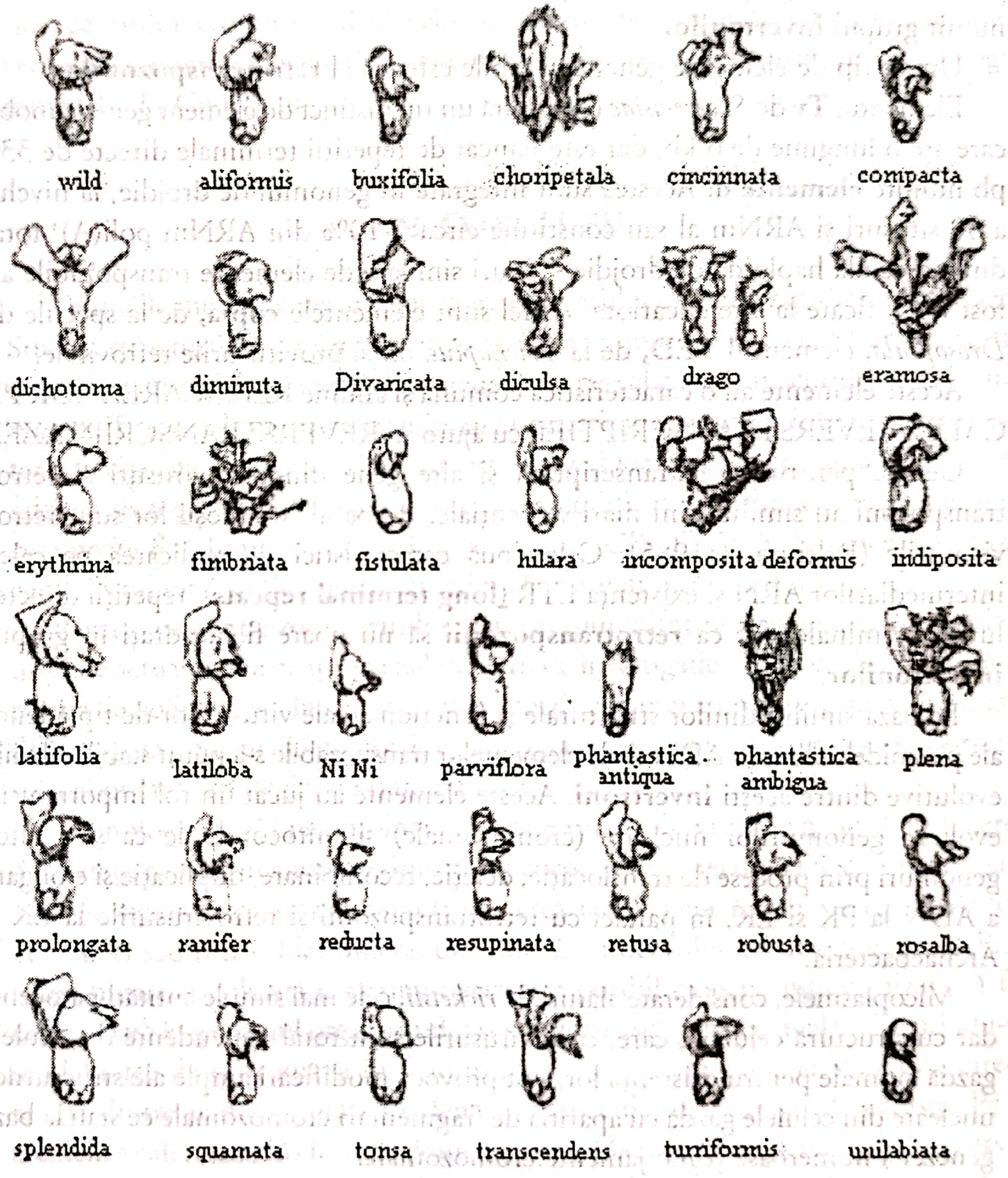

wild
aliformis
buxifolia
choripetala
cincinnata
compacta
dichotoma
diminuta
Divaricata
diculsa
drago
eramosa
erythrina
fimbriata
fistulata
hilara
incomposita deformis
indiposita
latifolia
latiloba
Ni Ni
parviflora
phantastica - antiqua
phantastica ambigua
plena
prolongata
ranifer
reducta
resupinata
retusa
robusta
rosalba
splendida
squamata
tonsa
transcendens
turriformis
unilabiata

Fig. 15. Mutații care afectează forma florii la gura leului *Anthirrhinum majus* (după Stubbe, 1966, din Rédei, 1986).

similitudinilor genetice ale transpozazelor, de la diferitele elemente transpozabile. Adenovirusurile și plasmidele ADN lineare S-1 și S-2 de la porumb au aceeași proprietate ca și elementele genetice mobile și anume de a se insera în, și de a fi excizate din, cromozomul gazdă sau ADN mitocondrial. Această caracteristică și similitudinile în structurile terminale ar putea justifica gruparea acestor elemente genetice într-un grup, pe baza proprietăților structurale, funcționale și evolutive numit grupul **invertonilor**.

Un alt tip de elemente genetice mobile este cel al **retrotranspozonilor**.

Elementul **Ty** de *S. cerevisiae* reprezintă un tip distinct de element genetic mobil care are o lungime de 6 kb, dar este flancat de repetiții terminale directe de 334 pb numite **elemente d**. Acestea sunt integrate în genomul de drojdie, la nivelul a 30 situsuri și ARNm al său constituie circa 5-10% din ARNm poli$(A)^+$ total dintr-o celulă haploidă de drojdie. Tipuri similare de elemente transpozabile au fost identificate la alte eucariote. Astfel sunt elementele **copia,** de la speciile de *Drosophila*, elementul **TED,** de la *Trichoplusiani* și provirusurile retrovirale.

Aceste elemente au o caracteristică comună și anume REPLICAREA LOR PE CALEA REVERSTRANSCRIPȚIEI, cu ajutorul REVERSTRANSCRIPTAZEI.

Genele pentru reverstranscriptază și alte gene din retrovirusuri și retrotranspozoni au similitudini mari secvențiale. Probabil, strămoșii lor sunt retrovirusurile (Baltimore, 1985). Cele două caracteristici — replicarea pe calea intermediarilor ARN și existența LTR (**long terminal repeats**), repetiții directe, lungi, terminale, fac ca **retrotranspozonii** să nu poare fi încadrați în grupul **invertronilor.**

Pe baza similitudinilor structurale și funcționale ale virusurilor de tip adeno, ale plasmidelor lineare ADN și ale elementelor transpozabile s-a putut stabili relațiile evolutive dintre acești **invertroni**. Aceste elemente au jucat un rol important în evoluția genomurilor nucleare (cromozomale) și mitocondriale ca și a altor genomuri prin procese de translocație, deleție, recombinare, duplicație și elongare a ADN la PK și EK, în paralel cu retrotranspozonii și retrovirusurile la EK și Archaebacteria.

Micoplasmele, considerate alături de *ricketsii*, cele mai simple entități patogene, dar cu structură celulară, care, ca și virusurile sunt total dependente de celulele gazdă animale pentru existența lor, pot provoca modificări ample ale structurilor nucleare din celulele gazdă cu apariția de fragmentări cromozomale ce stau la baza genezei a numeroase rearanjamente cromozomale.

Micoplasmele, în infecții cronice ale culturilor de leucocite sau de amnios uman, determină remanieri cromozomale, goluri monocromatidice, rupturi cromozomale, translocații, dicentrici, pulverizări cromozomale, apărute în urma competiției dintre mycoplasme și celula gazdă pentru precursori ai acizilor nucleici, întreruperea sintezei ADN determinând apariția unor goluri pe cromatide.

Ciupercile din ordinul Chitridiales determină aberații cromozomale la Euglena, iar microsporidiile (protozoare) produc hipertrofii remarcabile ale cromozomilor politeni la *Rhyncoscyara angelae*.

Chiar și unele microsporidii — dintre prototiste (protozoare) pot induce alterări ale aparatului cromozomal al celulelor gazde nevertebrate cu formarea unor veritabile creșteri oncogenetice, așa cum a evidențiat, pentru prima oară, zoologul român Radu Codreanu.

8. CONCLUZII

Tehnicile moderne permit detectarea mutațiilor cu mare rapiditate și precizie. Studiul structurii fine a genei i-a permis lui Seymour Benzer să stabilească că cea mai mică subunitate de mutație a genei este perechea de nucleotide și s-a numit *muton*. Tot astfel, pentru recombinarea genetică, cea mai mică subunitate este tot perechea de nucleotide și se numește *recon*. Doar gena, în totalitatea secvenței sale, cu sectoare necodificatoare și sectoare codificatoare, funcționează o unitate care poate fi delimitată prin aplicarea testului CIS-TRANS. Din această cauză, gena, în calitatea ei de unitate funcțională s-a mai numit și CISTRON.

Pentru evidențierea mutațiilor genice (punctiforme), genetica moleculară dispune actualmente de un arsenal modern de investigație. Tehnica PCR, utilizând reacția de polimerizare în lanț, permite detecția acestora cu o putere de discriminare de o singură pereche de nucleotide, ceea ce are un impact major în diagnosticare și în abordarea strategiei de tratament.

Tehnologia ADN recombinant permite sinteza in vitro de gene cu inducerea de mutații țintite (în anumite situsuri), încorporarea genei care a fost mutagenizată într-un vector corespunzător și introducerea acestei gene într-o celulă inițială (ou sau zigot) sau într-o blastomeră, din care se va dezvolta un nou organism. Prin recombinare omoloagă (crossing-over) este posibil ca gena mutagenizată să fie inserționată în genomul organismului și să înlocuiască gena normală. Urmărindu-se modalitatea de exprimarea în fenotip a unei asemenea gene, se stabilește direct relația dintre natura mutației și fenotipul specific, determinat de aceasta. Pe o asemenea cale, s-a ajuns într-un domeniu nou al Geneticii moderne, cel al *Geneticii reversate* și al obținerii de *animale transgenice* de tip **knockout**, adică gene a căror funcție este în mod voit abolită. Asemenea animale sunt de mare utilitate în studiile moderne de Genetică moleculară, Oncogenetică și Imunogenetică.

CAPITOLUL XXX

MUTAȚII DINAMICE

Genomul uman conține numeroase secvențe repetitive care variază în funcție de complexitatea unităților de repetiție, de la o singură sau câteva nucleotide, până la o gena întreagă (cum ar fi genele pentru ARN ribozomal). Organizarea fizică a secvențelor repetitive poate varia de la copii dispersate în întreg genomul ale unor secvențe lungi și complexe, până la secvențe cu compoziție simplă, ordonate în tandem. Dintre cele mai comune și simple secvențe repetitive sunt repetițiile de două nucleotide. Există alte astfel de repetiții simple în tandem (STR – *simple tandem repeats*), care implică unități de repetiție mono-, tri-, tetra-, și pentanucleotice. Multe dintre aceste secvențe repetitive STR sunt polimorfice în populatiile umane, în ceea ce privește numărul de copii.

O trasătura importantă a STR-urilor trinucleotidice este capacitatea lor de a sta la baza inducerii de mutații dinamice. Mutația dinamică este un proces de modificare cantitativă a structurii materialului genetic de la o generație la alta. Aceste mutații dinamice se deosebesc de mutațiile convenționale (statice) prin câteva caracteristici:

1. spre deosebire de secvența originală a ADN, produsul unei mutații dinamice prezintă o probabilitate diferită de a suferi modificări ulterioare;

2. probabilitatea apariției mutației dinamice a unui STR este legată de numărul de unități repetitive .

3. mutația dinamică a unei secvențe repetitive ADN, de la condiția normală, nepatologică, până la boala, este un proces care implică multiple modificări (cel mai adesea mici), nefiind deci un eveniment unic.

S-a demonstrat că mutații dinamice care sunt implicate în maladii pot fi datorate doar repetiției a două trinucleotide (din 10 posibile).

Începând cu anul 1991, expansiunea secvențelor repetitive de tipul (CTG)n. (CAG)n, (CGG)n . (GAA)n sau (GAA)n . (TTC)n, a fost asociată cu o serie de 14 maladii neurodegenerative și cu 3 situsuri fragile. Aceste boli sunt prezentate în tabelul 1, alături de informații privitoare la lungimea repețiilor și posibilele defecte moleculare asociate acestora. Apariția în populație a acestor **„boli ale repețiilor triple“** merge de la cele mai comune, cum ar fi sindromul X fragil și distrofia miotonică de tip I (DM), la cele mai rare, cum ar fi atrofia palidolusiană dentatorubrală. Situsurile fragile au fost primele identificate în maladii asociate cu mutațiile dinamice. Sindromul X fragil este cea mai comună formă de retardare mentală familială. Gena implicată, FMR1, codifică o proteina de legare la ARN care este larg exprimată la nivelul testiculelor, uterului și creierului, în embrion și făt. Splicing-ul ARN alternativ produce un număr mare de izoforme în țesuturi diferite.

Mai mult decât atât, frecvența acestor maladii variază între populații. De exemplu, ataxia spinocerebelară tip II (SCA2) este considerată cea mai comună dintre aceste boli în India [Saleem, 2000].

Tabelul 1. Repetiții trinucleotidice în boli genetice umane

MALADIA	GENA	LOCUSUL	REPETIȚIA	LUNGIMEA REPETIȚIEI			EFECTUL BIOLOGIC, POSIBIL AL PROTEINEI
				Normală	**Premutație**	**Maladie**	
Sindromul X fragil	FMR 1 (FRAXA)	Xq37.3	(CGG)n	6-52	59-130	230-2000	Proteina FMR 1 (FMRP), metilarea promotorului/ silențiere genică, pierderea funcției FMRP
Sindromul XE fragil	FMR 2 (FRAXE)	Xq28	(CCG)n	4-39	?(31-61)	200-900	Proteina FMR2/ metilare
Situs fragil	XF FRAGIL (FRAXF)		(CGG)n	7-40	?	306-1008	Metilare
Situs fragil	FRA 16A		(CCG)n	16-49	?	1000-1900	Metilare
Sindromul Jacobsen	FRA 11B		(CGG)n	11	80	100-1000	Metilare
Atrofia musculară spino-bulbară (SMBA) (boala Kennedy)	AR	Xq13-21	(CAG)n	14-32	?	40-55	Receptor pentru androgen (RA)/ expansiunea regiunii poliglutaminei

Distrofia miotonică tip I	DMPK	19q13	(CTG)n	5-37	50-80	80-1000	Protein kinaza distrofiei miotonice/ procesarea ARN alterat și transport, expresia genei alterate datorită modificărilor cromatinei
Boala Huntington	HD	4p16.3	(CAG)n	10-34	36-39	40-121	Huntington/ expansiunea poliglutaminei
Ataxia spino-cerebeloasă 1	SCA 1	6p23	(CAG)n	6-44	-	39-82	Ataxina 1/ expansiunea poliglutaminei
Ataxia spino-cerebeloasă 2	SCA 2	12q24.1	(CAG)n	14-31	-	34-59	Ataxina 2/ expansiunea poliglutaminei
Ataxia spino-cerebeloasă 3 (boala Machado Joseph)	SCA 3	14q32.1	(CAG)n	13-44	fără aplicație	55-84	Ataxina 3/ expansiunea poliglutaminei
Ataxia spino-cerebeloasă 6	SCA 6	19p13	(CAG)n	4-18	fără aplicație	21-33	Subunitate a canalului pentru calciu dependent de voltaj $a_{1A/}$ expansiunea poliglutaminei
Ataxia spino-cerebeloasă 7	SCA 7	13p12-13	(CAG)n	4-34	fără aplicație	37-306	Ataxina 7/ expansiunea poliglutaminei
Ataxia spino-cerebeloasă 8	SCA 8	13q21	(CTG)n	15-27?	110-200		3' la gena SCA8/ Alterează expresia genică a genelor adiacente?
Ataxia spino-cerebeloasă 12	SCA 12	5q31-33	(CAG)n	7-28	?	66-78	5' la ASC12/ alterează expresia genică?
Atrofia dentatorubrală-palidolusiană	DRPLA	12p13.31	(CAG)n	7-25	?	49-75	expansiunea poliglutaminei
Ataxia Friedreich	X 25	9q13-21.1	(CAA)n	6-29	?(>34-40)	200-900	Frataxina/ regiune repetitivă într-un intron; producerea ARN alterat, replicare alterată

In cazul acestor maladii, poziția repetițiilor variază în privința regiunilor genice codificatoare afectate. Aceste repeții se găsesc fie la capătul 5' al genei, în regiunea codificatoare (exoni) și/sau în introni, sau la capatul 3' al genei (fig. 1). Datorită acestor diferențe de localizare, rolul acestor repetiții în etiologia moleculară a bolilor este diferit în funcție de maladie. Maladiile asociate cu repetiția (CGG)n se pare că implică metilarea ADN care conține repetițiile extinse CGG, ceea ce conduce la silențierea genei respective. În DM, SCA8 și SCA12, localizarea la capatul 3' a repetițiilor poate conduce la o procesare aberantă a ARNm sau o exprimare aberantă a genelor care se află în proximitatea genei afectate. Maladiile care au la bază modificări ale genelor ce conțin repetiții CAG în regiunile codificatoare formează un grup distinct în care se codifică lanțuri de poliglutamină. Etiologia moleculară implică producerea unei proteine cu un tronson poliglutaminic, iar modelul experimental reprezentat de șoarece a demonstrat că poliglutamina funcționează ca o moleculă neurotoxică [Heintz și Zoghbi, 2000] .

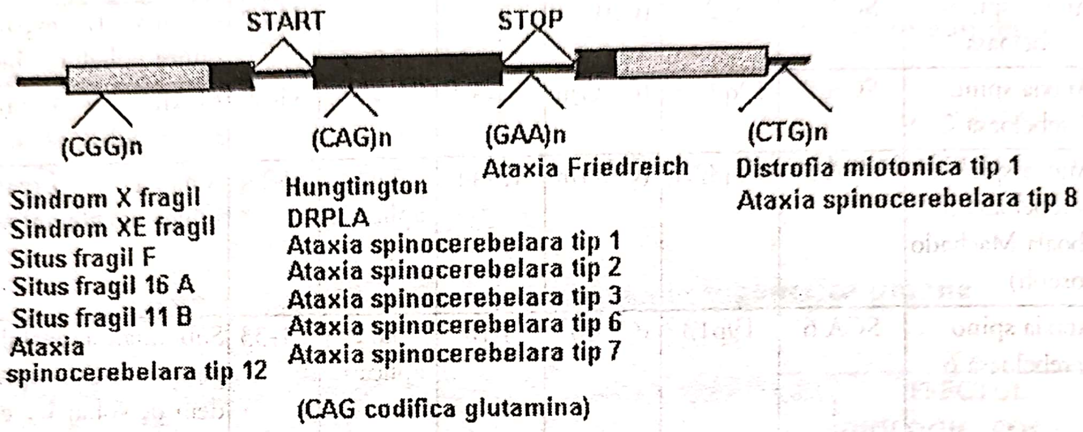

START
STOP
(CGG)n
Sindrom X fragil
Sindrom XE fragil
Situs fragil F
Situs fragil 16 A
Situs fragil 11 B
Ataxia spinocerebelara tip 12
(CAG)n
Hungtington
DRPLA
Ataxia spinocerebelara tip 1
Ataxia spinocerebelara tip 2
Ataxia spinocerebelara tip 3
Ataxia spinocerebelara tip 6
Ataxia spinocerebelara tip 7
(CAG codifica glutamina)
(GAA)n
Ataxia Friedreich
(CTG)n
Distrofia miotonica tip 1
Ataxia spinocerebelara tip 8

Fig. 1 — Localizarea repetițiilor trinucleotidice în gene.

Există câteva caracteristici importante asociate cu această clasă de boli. În primul rând, expansiunea tripletelor de repetiții reprezintă un nou tip de mutație. Această mutație nu a fost identificată în modelele experimentale clasice, reprezentate de bacteriofagul T4, *Escherichi coli*, *Drosophila* și drojdii. În al doilea rând, deși instabilitatea genetică se întâlnește și la *E. coli* și drojdii, aceste organisme nu exprimă înclinația către multiplicare a numărului de repetiții, așa cum se întâmplă în mod natural, la om. Deși această expansiune poate fi observată, aceste repetiții sunt des deletate. Astfel, expansiunea mutațiilor asociate cu bolile, în special expansiunea observată de-a lungul generațiilor, rămâne un fenomen strict legat de om. Recent a fost raportat fenomenul de expansiune dependent de vârstă.

În al treilea rând, natura mutației, ce se întinde pe mai multe generații, nu respectă legile mendeliene ale geneticii clasice. Aceste boli manifestă fenomenul de **anticipație**, ceea ce înseamnă că de-a lungul generațiilor succesive, penetranța și severitatea bolii crește, iar vârsta la care debutează boala descrește. Nu există nici o strategie terapeutică de prevenire sau încetinire a expansiunii repetițiilor trinucleotidice. În timp ce defectele moleculare biologice sau biochimice provocate de acest tip de maladii sunt variabile, cauza genetică este aceeași, reprezentată de același tip de triplete repetitive.

Au fost propuse numeroase modele pentru analizarea expansiunii repetițiilor. Expansiunile sau delețiile pot apărea prin simpla nealiniere a primerilor în cursul replicării, astfel încât capătul 3' al primerului nascent dehibridizează de pe catena matriță și rehibridizează în aval sau în amonte față de situsul de replicare. Alunecarea în amonte va fi corelată cu extinderea repetițiilor, în timp ce alunecarea în aval va fi legată de deleția repetițiilor. O singură alunecare sau eveniment de recombinare

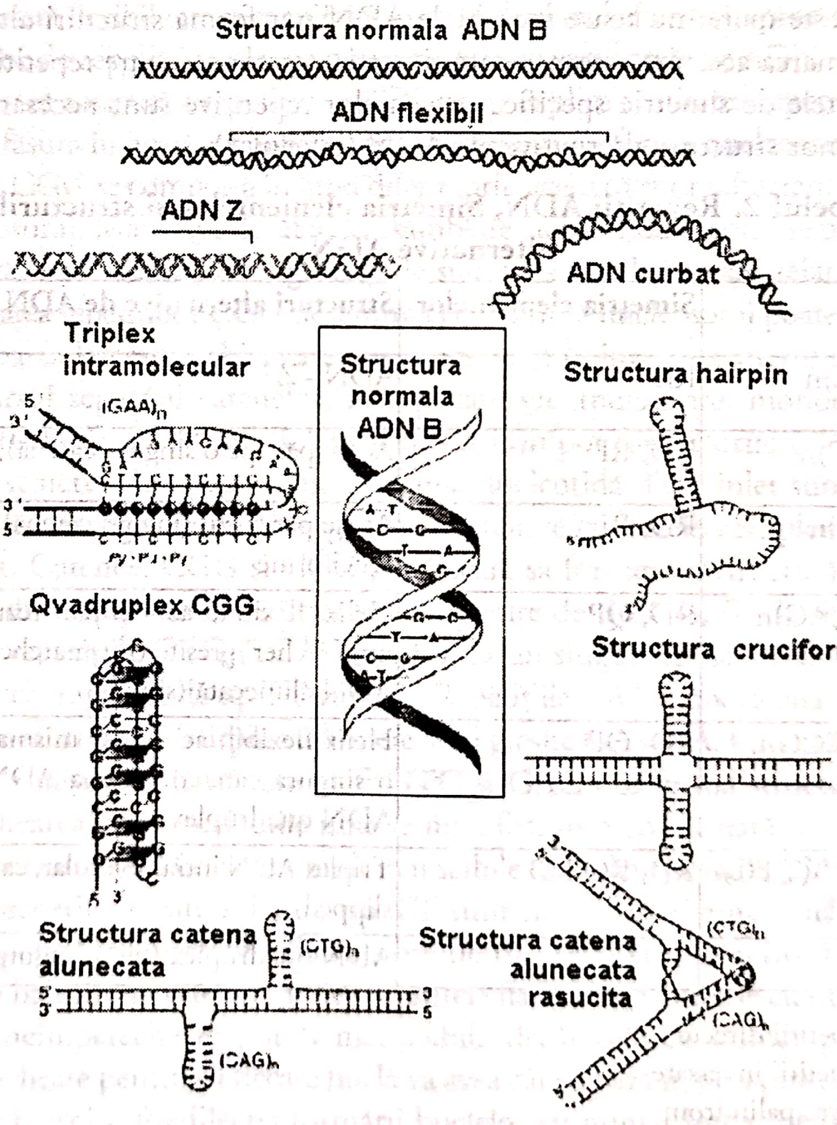

Structura normala ADN B
ADN flexibil
ADN Z
ADN curbat
Triplex intramolecular
(GAA)n
Py·Pu·Py
Structura normala ADN B
Structura hairpin
Qvadruplex CGG
Structura cruciforma
Structura catena alunecata
(CTG)n
(CAG)n
Structura catena alunecata rasucita
(CTG)n
(CAG)n

Fig. 2 — Structuri alternative ADN legate de repetiții de trinucleotide.

va fi legat cel mult de dublarea secvenței repetitive. În multe cazuri, apar extinderi de 10 sau mai multe ori mai mari, ceea ce sugerează că survin mai multe evenimente de alunecare sau recombinare. Sinteza repetată a ADN, incluzând evenimentele repetitive de **slippage** poate conduce la o expansiune mai lungă decât cea originală. Sinden și Wells (1992) sugerează că expansiunea masivă poate rezulta din sinteza repetată de ADN mediată de blocarea fizică a replicării. Blocarea fizică a replicării poate implica formarea unei structuri speciale a ADN, datorată secvențelor repetitive.

Structurile alternative de ADN diferă față de structura clasică ADN B, descrisă în anul 1953, de către Watson și Crick. Structurile alternative includ curbarea ADN, ADN flexibil, ADN paralel, ADN triplex, ADN qvadruplex, ac de păr (hairpin), structuri cruciforme, ADN-Z (fig. 2). În timp ce lista structurilor secundare este mare, nu toate secvențele ADN pot forma structuri alternative. Pentru formarea acestora este necesară simetria acestor secvențe repetitive.

Elementele de simetrie specifice secvențelor repetitive sunt necesare pentru formarea unor structuri alternative ale ADN (tabelul 2).

Tabelul 2. Repetiții ADN, Simetria elementelor și structurile alternative ADN

Repetiție	**Simetria elementelor**	**Structuri alternative de ADN**
(GT)n ·(AC)n	RD	ADN –Z
(GC)n ·(GC)n	RD, RI	Ac de păr (pe o singură catenă), ADN -Z
(AT)n ·(AT)n	RD, RI	Ac de păr (pe o singură catenă), structuri cruciforme
(CTG)n ·(CAG)n	RD, QP	Helix flexibil, ac de păr rezultat prin împerecheri greșite (mismatched), catena ADN alunecată (slipped)
(CGG)n ·(CCG)n	RD, QP	Helix flexibil, ac de păr mismatched (pe o singură catenă), catena ADN slipped, ADN quadruplex
(GAA)n ·(TTC)n (GGGGTT)n	RD, RO RD	Triplex ADN intramolecular, catena ADN slipped
		ADN quadruplex (pe o singură catenă)

RD- repetiții directe
RI – repetiții inversate
QP – qvasipalindrom
RO – repetiții tip mirror (imagine „în oglindă“)

Moleculele de ADN lineare și care conțin secvențe repetitive prezintă parametri neobișnuiți ai axei helixului ADN, care se accentuează în cursul acumulării de elemente repetitive. Migrarea anormal de rapidă a secvențelor cu repetiții trinucleotidice în gelul de poliacrilamidă a fost atribuită unei creșteri a flexibilității dublelor helixuri (GAG)n . (CTG)n și (CGG)n. (CCG)n. Pe baza persistenței lungimii și rigidității torsionale a ADN, derivate din baza de date a structurilor cristaline ADN, o flexibilitate crescută a duplexului poate fi explicată printr-o acumulare a unei flexibilități crescute a pașilor dinucleotidici d (CA) d (TG), d (GC) d (GC) și d (CG) d (CG) care sunt părți ale repetițiilor în triplet. Estimările experimentale arată că flexibilitatea asociată cu cel puțin 4 repetiții CTG $[(CTG)_4]$ poate să fie la fel de mare ca aceea a împerecherii greșite a două nucleotide (TT) (TT). Această flexibilitate se manifestă în modul cel mai eficient în procesul ciclizării secvențelor de repetiții triple, prin comparație cu secvențele de ADN amestecate. Flexibilitatea crescută a repetițiilor CTG poate explica afinitatea repetițiilor CTG de a se înfășura în jurul octamerilor histonici pentru a forma nucleosomii. Totusi, repetițiile CGG se comportă în mod diferit, prin aceea că sunt refractare la formarea de nucleosomi. Mai mult decât atât, asamblarea lor în nucleosomi se petrece într-o manieră dependentă de lungime și de starea de metilare. Deși relativ flexibile, incapacitatea repetițiilor CGG de a forma cu ușurință nucleosomi poate fi explicată prin curbarea laterală stabilă care este inadecvată în jurul octamerului histonic.

In cursul separării catenelor, în replicare sau transcriere, monocatenele cu repetiții (CTG)n, (CAG)n, (CGG)n și (CCG)n pot forma structuri hairpin. În astfel de structuri hairpin, prima și ultima nucleotidă din triplet sunt implicate în formarea de legături de hidrogen intracatenare cu bazele complementare din alt triplet. Catenele CGG și CCG pot fiecare să formeze o structură hairpin în două moduri, implicând fie împerecheri greșite de tip GG, fie de tip CC. Prin contrast, repetițiile CTG și CAG pot forma un singur tip de structură hairpin, cu împerecheri greșite de tip TT sau AA. Repetițiile GAA monocatenare pot forma de asemenea structuri hairpin cu împerecheri greșite GA și AA. Câteva alte repetiții de triplete monocatenare cum ar fi GTC și GAC pot forma structuri hairpin, deși implicarea lor în maladiile umane nu a fost încă confirmată.

Hairpin-urile (CTG)n sunt mult mai stabile decât hairpinurile (CAG)n pentru că împerecherile greșite mici de tip TT sunt mai bine stivuite în elicea ADN, decât împerecherile greșite voluminoase de tip AA. Dacă pattern-ul de pliere a structurii hairpin nu este dirijat de secvențele flancatoare, buclele cu număr impar de baze neîmperecheate pot fi mai stabile decât cele cu număr par de baze neîmperecheate pentru că fiecare buclă va avea câte o bază în plus care să stabilizeze structura hairpin. Predilecția formării buclelor cu număr impar de baze azotate are ca rezultat alunecarea mai frecventă a polimerizării cu 2 triplete decât cu una.

Hairpinurile formate de triplete $(CGG)_{15}$ sunt mai stabile decât cele formate de $(CCG)_{15}$. În acest caz, împerecherea greșită mai puțin voluminoasă, de tip CC, poate avea un efect destabilizator mai mare decât împerecherea voluminoasă de tip GG, deoarece într-o secvență lungă CCG, duplexul formează un motiv în E, în care împerecherile de tip CC nu sunt bine stivuite și citozinele devin extrahelicale. La fel se întâlnește cu hairpinurile de tip (CTG)n și (CAG)n, în structurile lungi de tip (CGG)n și (CCG)n, în care buclele impare sunt prevalente.

Indivizii cu ataxie Friedreich, legată de repetiții de tipul (GAA)n (TTC)n, prezintă deficiențe în maturarea ARNm transcis după gena X25 care codifică pentru proteina numită **frataxina**. Nivelele scăzute de ARNm pot fi rezultatul unei blocări a transcripției datorată, de exemplu, unei structuri hairpin GAA. Un **triplex intramolecular** de tip pirimidină-purină-pirimidină se poate forma într-o structură (GAA)n (TTC)n, sub influența superrăsucirii negative și a Ph-ului scăzut. O structură alternativă, posibil pirimidină-purină-purină, se poate forma la pH neutru, în structurile de tip (GAA)n (TTC)n, când n = 38, dar nu și când n = 16. De asemenea, această structură poate să determine o blocare a transcripției. Formarea unei structuri triplex a fost sugerată a se realiza între un duplex (GAA) (TTC) și o catenă de ARNm GAA. Totuși, acest triplex ADN–ARN este foarte puțin probabil să existe, deoarece ADN nu formează triplexuri cu catene de ARN purinic. O structură bi-triplex, denumită ADN „lipicios“ se poate forma prin asocierea a două triplexuri pirimidină-purină-purină, în moleculele de ADN superrăsucite negativ.

Secvențele de ADN care conțin guanină pot forma structuri de tip **quadruplex** ce sunt stabilizate prin legături de hidrogen de tip **Hoogsteen,** între bazele guaninice. S-a demonstrat că oligonucleotidele scurte (CGG)n, unde n = 4-7, se asociază pentru a forma structuri moleculare qvadruplex. O blocare a polimerizării pentru (CGG)20 a fost interpretată ca o consecință a formării unei structuri quadruplex. În mod similar, structurile quadruplex pot bloca replicarea pentru repetițiile (CGG)n, (AGG)n și (TGG)n, ca și pentru secvențele pure poli (G). Deși repetițiile lungi CGG (n = 8,11) par să prefere formarea unei structuri hairpin, față de formarea unei structuri quadruplex, asocierea a două structuri hairpin poate conduce la apariția unui quadruplex.

CAPITOLUL XXXI

PROCES REPARATOR

1. GENERALITĂȚII

ADN este singura macromoleculă celulară capabilă de a fi reparată, după ce a suferit leziuni structurale. Mai mult, ea codifică pentru variatele și numeroasele enzime implicate în procesul de reparare.

În lupta pentru supraviețuire, organismele au elaborat mijloace de apărare prin care au contracarat multiplele și permanentele tendințe ale mediului extern de a le destrăma. O privire de ansamblu asupra nenumăratelor posibilități pe care organismele vii le au spre a-și menține la parametrii normali structurile și funcțiile aferente lor, ne dă posibilitatea descifrării unor adevărate trepte în apărarea vieții, începând cu cea moleculară, trecând prin cea celulară și ajungând la cea a individului și speciei în ansamblul ei.

La nivel molecular, mijloacele de apărare sunt eminamente de natură ereditară și cunoscute fie ca procese de corecție a copierii sau a citirii **(proof reading)**, desfășurate în cadrul replicării ADN, fie ca proces reparator al leziunilor induse în structura ADN.

Repararea ADN este implicată în procese care minimalizează moartea celulară, efectul mutațiilor, persistența leziunilor din ADN și instabilitatea genomică. Anomalii ale acestor procese au fost implicate în procesele de îmbătrânire și carcinogeneză. (fig.1)

Greșelile care apar în cursul replicării pot fi, pe de o parte, alterări spontane care se clasifică în greșeli de încorporare sau de includere (substituții de baze în timpul replicării), greșeli de împerechere de baze azotate (reprezentând în esență substituții anormale de baze, determinate de instabilitatea inerentă chimic a bazelor sau a legăturii N-glicozilice), iar pe de altă parte, alterări induse, determinate de alte substanțe chimice și agenți de mediu.

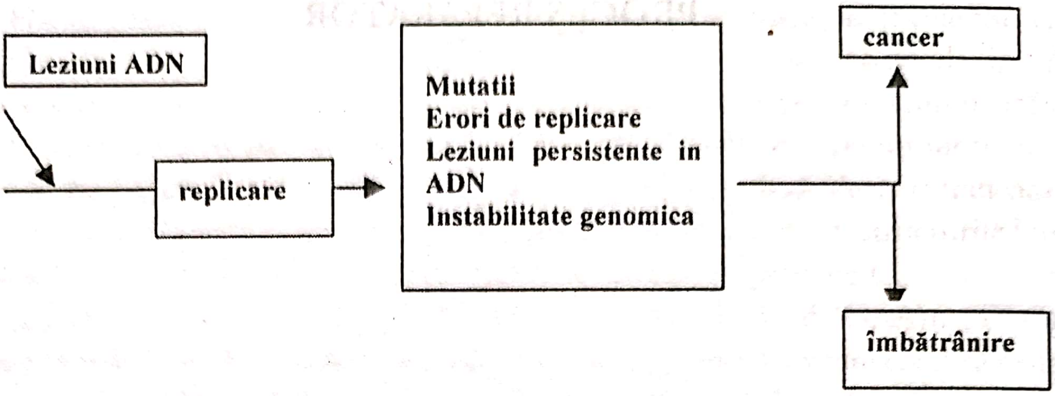


Fig. 1 — Funcțiile reparării ADN.

Ca urmare, pot apare următoarele defecte:

– o bază incorectă într-o catenă care nu poate forma punți de hidrogen cu baza corespunzătoare din cealaltă catenă;

– dezaminarea spontană a citozinei care devine uracil, urmată de conversia uracilului spre timină, prin activitatea sistemului N-glicozilazic. Mai puțin frecventă este dezaminarea adeninei, spre a forma hipoxantina care se împerechează cu citozina;

– deleții de baze prin ruperea punții N-glicozilice a unei nucleotide purinice, care are loc spontan, la temperaturi fiziologice, deși cu o rată foarte scăzută, procesul numindu-se depurinizare, deoarece purina este pierdută din ADN. Depurinizarea crește cu scăderea pH-ului și ridicarea temperaturii.

Enzima de replicare ADN-polimeraza are capacitatea de face un fel de „control de calitate" al replicării, și anume, acolo unde apare o bază greșit împerecheată cu o altă bază din matriță o excizează, în molecula sa aflându-se o regiune ce poate efectua activitate exonucleazică implicată în excizia bazelor greșit împerecheate. De regulă, dacă ADN polimeraza este normală, ea îndeplinește controlul de **„proof reading"**, deoarece, numai în condițiile în care, în timpul replicării se realizează perechi specifice de baze azotate de tip Watson-Crick (A-T, T-A, G-C, C-G), ea suferă o astfel de conformație spațială care îi permite să se poată deplasa pe matriță, asigurând în continuare copierea matriței și sinteza catenei complementare.

Un mecanism de apărare a integrității structurale și funcționale a materialului genetic, este întâlnit la bacterii și este cunoscut sub denumirea de proces de **restricție — modificație.** Prin acest mecanism, bacteriile pot deveni rezistente la virusuri specifice — bacteriofagii. Bacteriile dețin un complex aparat enzimatic care determină recunoașterea specifică a ADN exogen (al invadatorului fagic) pe care îl scindează la anumite situsuri pe care le recunosc după specificitatea secvenței. Asemenea enzime se numesc endonucleaze de restricție sau restrictaze. Fragmentele rezultate din macromolecula de ADN numite restricte nu mai pot îndeplini funcția normală și ele sunt ulterior hidrolizate sub acțiunea altor enzime hidrolazice, din același grup al DN-azelor din care fac parte și endonucleazele de restricție.

Restricția este întotdeauna cuplată cu modificația — un proces de modificare chimică (metilare, acetilare, etc.) a unor baze de la nivelul anumitor secvențe de ADN, proces realizat prin intermediul unor enzime specifice (metilaza, acetilaza etc). Astfel, este modificat propriul ADN, pentru a nu cădea sub incidența propriilor enzime degradatoare — endonucleazele de restricție.

În celulele normale, multe dintre efectele nocive ale radiațiilor sau substanțelor chimice mutagene care produc alterări în structura macromoleculei ADN sunt reparate înainte ca acestea să se exprime. În procesul de reparare a leziunilor din ADN intervine un complex aparat enzimatic. Când aparatul enzimatic de reparare este ineficient, erorile apărute în secvența de baze nu pot fi corectate și apare mutația. Existența mecanismului de sinteză reparatorie a fost pusă în evidență prin descoperirea unor mutante bacteriene cu sensibilitate crescută față de acțiunea nocivă a radiațiilor sau agenților chimici mutageni.

Leziuni în structura ADN apar și ca urmare a acțiunii unor enzime nucleazice endogene și a infecției virale. De asemenea, apar rupturi în macromolecula ADN în timpul împachetării cromozomilor virali în capsidă. Fără un sistem eficient de reparare, aceste alterări ar duce la moartea genetică, în sensul că, ar fi blocată replicarea normală a unui asemenea cromozom, organismul neputând da o descendență viabilă.

Leziunile produse de iradierea cu ultraviolete au fost cel mai mult studiate. Efectul cel mai comun al iradierii UV este formarea de legături chimice între două molecule adiacente de pirimidină, aflate pe aceeași catenă polinucleotidică și în special, între două molecule adiacente de timină. Aceasta conduce la formarea unui dimer de timină, făcând ca poziția lor în macromolecula de ADN să fie alterată, fiind slăbite sau chiar anulate punțile de hidrogen cu adeninele opuse, apărând o regiune distorsionată în dublul-helix ADN. Acestă distorsiune locală a dublului helix, consecință a absorbției radiației UV de către resturile adiacente de timină și a formării pe această cale a dimerilor de timină, sub cele două forme (fig. 2), împiedică funcționarea normală a genei a cărei secvență de nucleotide cuprinde și cele două timine adiacente. În afară de dimeri timină-timină, pot apare dimeri timină-citozină și dimeri citozină ca și cross-linkeri, adică legături încrucișate între pirimidinele de pe catene opuse care blochează separarea catenelor, necesară atât în replicare, cât și în transcriere. Un singur dimer de timină poate avea efect letal asupra celulei, dacă o asemenea leziune nu este reparată. Crosslinkerii apar și ca urmare a acțiunii substanțelor chimice mutagene precum nitrozoguanidina.

Razele X produc leziuni grave în macromolecula ADN, determinând ruperea catenelor polinucleotidice. Iperita determină legături chimice încrucișate între bazele

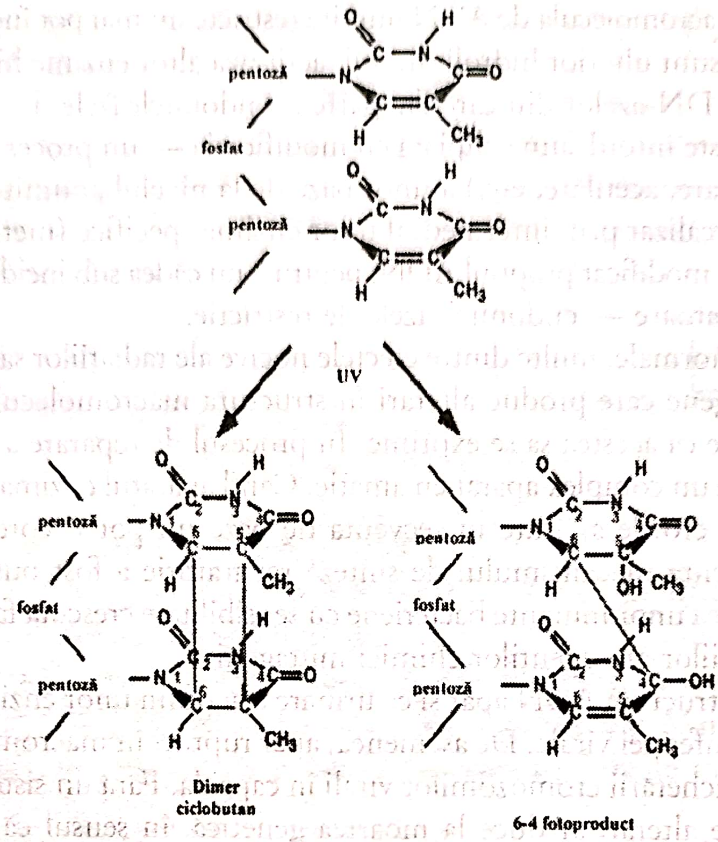


Fig. 2 — Formarea dimerilor de timină sub acțiunea iradierii UV.

purinice învecinate. Se întâlnesc, de asemenea, dereglări structural-funcționale cauzate de împerecherea greșită de baze necomplementare care conduc la nașterea de heteroduplexuri heterozigote prin recombinare sau mutație. Acestea sunt de regulă, supuse procesului de corecție reparatorie prin care perechile nelegitime de baze azotate sunt înlocuite cu perechi normale, având loc convertirea unui heteroduplex într-un homoduplex, a unui heterozigot molecular într-un homozigot. Eficiența sistemului reparator are specificitate de specie și chiar de individ și este influențată de factori de mediu precum temperatura, lumina sau starea de nutriție.

2. LEZIUNILE ADN

Principalele leziuni ale ADN sunt următoarele:

1) *Dezaminarea bazelor azotate*:

O bază incorectă într-o catenă nu poate forma o legătură de hidrogen cu baza corespunzătoare din catena complementară. Acest defect poate rezulta dintr-o eroare de replicare ce nu este corectată prin funcția de editare, situație rar întâlnită. Un eveniment mult mai comun este dezaminarea spontană a citozinei în uracil, urmată de substituirea uracilului de către timină. Mai puțin frecventă decât tranziția citozină→uracil→timină este dezaminarea ocazională a adeninei care conduce la hipoxantină ce se împerechează cu citozina.

2) *Depurinizarea*

Legătura N-glicozidică a unui nucleotid purinic se hidrolizează spontan la o temperatură fiziologică, cu o rată foarte scăzută. Acest proces se numește depurinizare, deoarece o bază purinică este eliminată din ADN. Rata de depurinizare este afectată de agenții alkilanți (folosiți frecvent în tratamentul cancerului) care reacționează cu guanina adăugând o grupare alkil la N7 al inelului purinic, producând în consecință un locus apurinic.

3) *Baze alterate*

Bazele pot fi modificate de o varietate de agenți fizici și chimici. De exemplu, radiațiile ionizante pot rupe inelele purinice și pirimidinice și, ca urmare, pot cauza o varietate de tipuri de alterări chimice. Cele mai frecvente substituții au loc la nivelul timinei. Dintre bazele alterate, cel mai bine studiat este dimerul de timină. În formarea dimerilor, dublul helix devine distorsionat, cauzând inhibiția bifurcației de replicare.

4) *Rupturi monocatenare*

O serie de agenți ca peroxizii, cisteina, anumiți ioni metalici precum Fe^{2+}, radiațiile ionizante etc., pot rupe legăturile fosfodiesterice conducând la apariția de rupturi monocatenare.

5) *Rupturi dublu-catenare*

Dacă o moleculă de ADN suferă un număr mare de ruptuti monocatenare, pot apărea două rupturi față în față, rezultând o ruptură dublu-catenară. Aceste leziuni apar ca urmare a expunerii la radiații cosmice, raze X și radiații γ.

6) *Legături intercatenare*

Sunt înlănțuiri covalente între o bază azotată dintr-o catenă și o bază azotată din catena complementară. Aceste legături încrucișate împiedică separarea catenelor în timpul replicării și, de asemenea, cauzează o distorsiune a helixului. Mitomicina C, antibiotic cu acțiune citostatică, este un inductor eficient al acestor legături, împiedicând replicarea ADN.

3. MUTAȚIILE *HOT-SPOTS*

Susceptibilitatea unei gene la mutație este direct proporțională cu mărimea genei. Într-o genă particulară, mutațiile nu sunt distribuite întâmplător, ci sunt limitate la unele situsuri. Situsurile în care pot să apară 10 sau 100 mutații se numesc „puncte fierbinți"mutaționale sau **„mutational hot spots".** În mutageneza chimică, unele baze ar putea exista în regiuni ale ADN, care sunt mai sensibile mutagenilor chimici. Cauza majoră a mutațiilor spontane, la *E. coli*, este deleția unei baze, însă alterarea cea mai frecventă este modificarea chimică a bazelor. Cea mai comună bază modificată este 5-metil-citozina generată de metilază care adaugă o grupare metil anumitor resturi de citozină aflate în situsuri specifice. Situsurile care conțin 5-metil-citozina (5MeC) devin puncte fierbinți pentru mutații punctiforme spontane.

În cursul evoluției s-au dezvoltat sisteme eficiente pentru corectarea greșelilor ocazionale, apărute în timpul replicării, dar și a modificărilor structurale induse de către agenții mediului înconjurător.

Mecanismele de reparare a dimerilor se împart în mecanisme fizice și mecanisme biochimice. Mecanismele fizice se realizează prin fotoreactivare, iar cele biochimice se realizează pe trei căi: excizie reparatorie, reparare postreplicativă recombinatorie, reparare prin sistemul SOS.

4. MECANISME DE REPARARE A LEZIUNILOR DIN ADN

4.1. Fotoreactivarea

Fotoreactivarea a fost descoperită în anul 1940, de către A. Kelner, la celulele de *E. coli*, iradiate cu UV, sau infectate cu virusuri, și la conidiile de *Streptomyces griseus* (acestea supraviețuiesc într-un procent mai mare dacă după iradiere sunt expuse la o sursă de lumină albastră și apoi sunt incubate la întuneric). Lumina vizibilă furnizează energia necesară desfacerii dimerilor de timină.

Fotoreactivarea implică o singură catenă ADN la nivelul căreia se află dimerul timină. Dimerii pirimidinici reprezintă cele mai frecvente leziuni din ADN, induse de iradierea UV. Fotoreactivarea determină liza punții care s-a format între resturile timină ale dimerului, convertind dimerul timină în monomeri de timină.

Fotoreactivarea este realizată prin activitatea unei enzime specifice numită *enzimă de fotoreactivare* sau *fotoliază* (**enzima PR**), întâlnită în aproape toate celulele, de la bacterii la animale. Enzima de fotoreactivare se asociază la întuneric cu dimerii de timină și determină monomerizarea lor, numai în urma absorbției unui foton de lumină (λ=4000Å). Enzima utilizează energia luminoasă pentru a oxida inelul ciclobutan al dimerului, lumina fiind preluată de către cromofori și

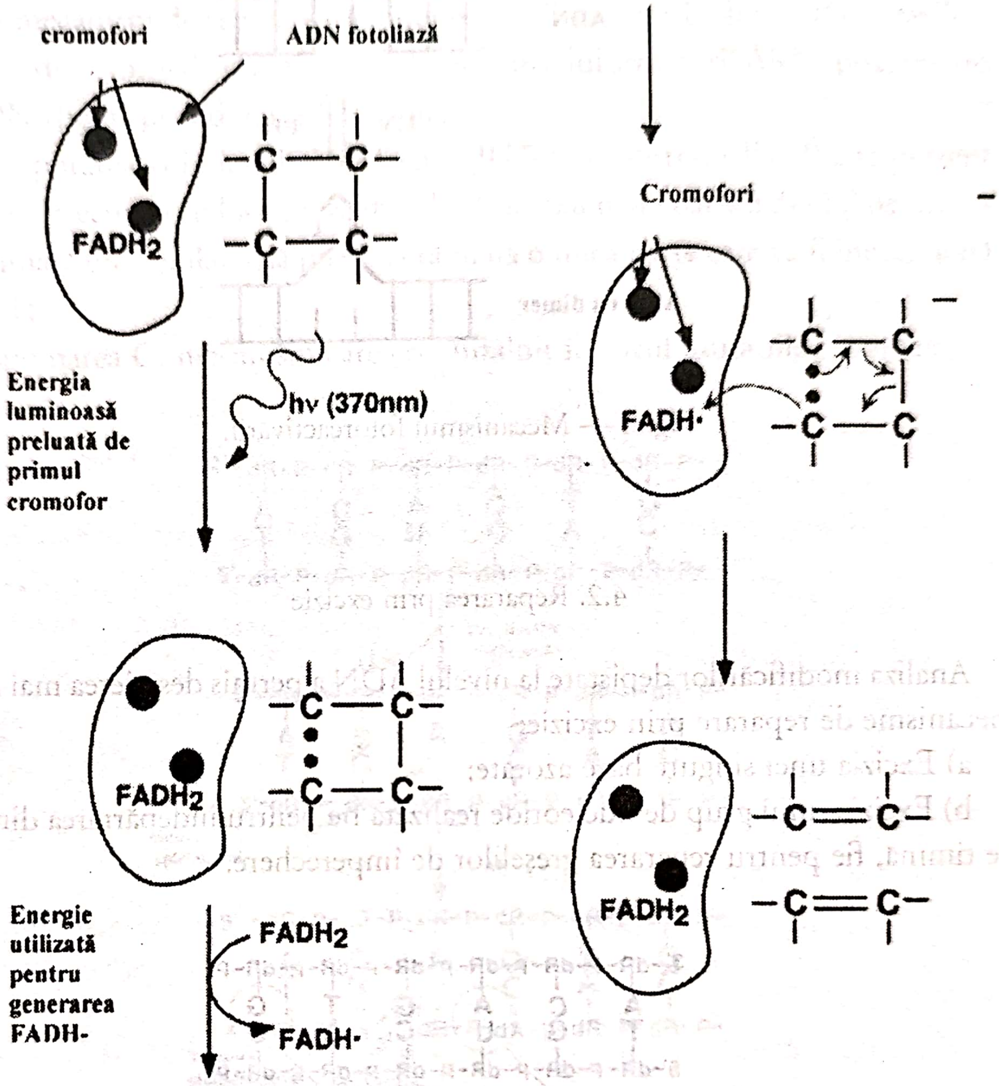

cromofori
ADN fotoliază
FADH2
Energia luminoasă preluată de primul cromofor
hv (370nm)
Energie utilizată pentru generarea FADH-
FADH2
FADH·
Cromofori
FADH·
FADH2

Fig. 3 — Fotoreactivarea dimerilor de timină.

utilizată pentru a produce radicali liberi (FADH-). Aceștia realizează mai departe oxidarea, readucând ADN la structura sa normală. (fig.3)

Fotoreactivarea apare ca cel mai simplu sistem de reparare a leziunilor ADN de tipul dimerilor timină, fiind totodată, singurul care necesită intervenția luminii vizibile. Fotoreactivarea necesită o singură intervenție enzimatică, neimplicând scoaterea bazelor din catenă sau ruperea legăturilor fosfodiesterice. (fig. 4)

Există mutații ale genei *phr* care determină absența capacității de fotoreactivare. Enzima de fotoreactivare a fost izolată și de la *Saccharomyces cerevisiae*, aceasta neputându-se lega la ADN normal, fără leziuni.

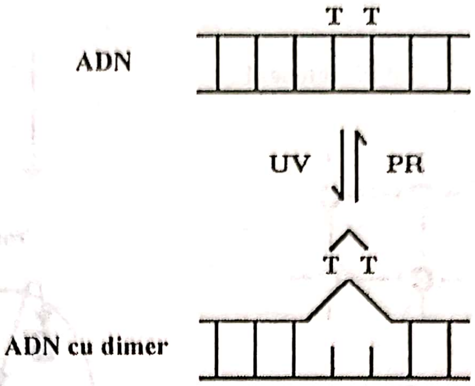

T T
ADN
UV
PR
T T
ADN cu dimer

Fig. 4 — Mecanismul fotoreactivării.

4.2. Repararea prin excizie

Analiza modificărilor depistate la nivelul ADN a permis descrierea mai multor mecanisme de reparare prin excizie:

a) Excizia unei singure baze azotate;

b) Excizia unui grup de nucleotide realizată fie pentru îndepărtarea dimerilor de timină, fie pentru repararea greșelilor de împerechere.

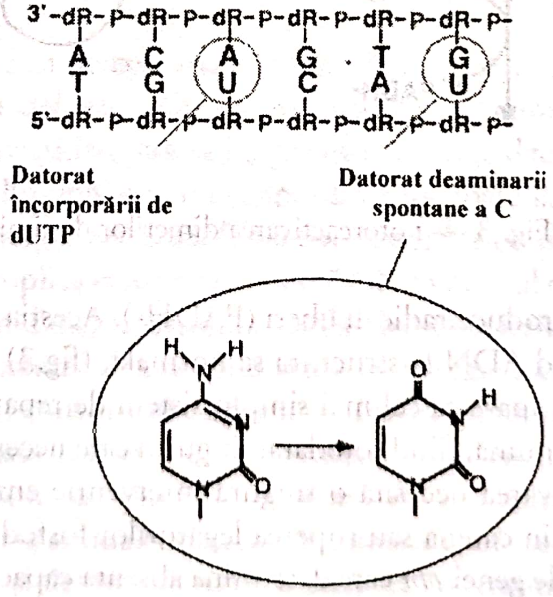

3'-dR-P-dR-P-dR-P-dR-P-dR-P-dR-P-
A C A G T G
T G U C A U
5'-dR-P-dR-P-dR-P-dR-P-dR-P-dR-P-
Datorat încorporării de dUTP
Datorat deaminarii spontane a C
H N H
N
N
O
O
H
N
N
O

Fig. 5 — Mecanismul de apariție a unui rest U în macromolecula ADN.

a) Excizia unei singure baze azotate

Acest mecanism de reparare este întâlnit la eliminarea U din ADN. Uracilul, care în condiții normale nu se găsește decât la nivelul structurii ARN, poate apare și în ADN (fig.5) prin două mecanisme:

– încorporarea sa în locul T, utilizând dUTP ca substrat (dUTP este prezent în celulă ca precursor în biosinteza dTTP). Cea mai mare parte a dUTP neutilizat este eliminată din celula, însă poate să rămână o mică parte care va fi încorporată în locul T;

– deaminarea C, mecanism care este întâlnit în cazul mutațiilor spontane.

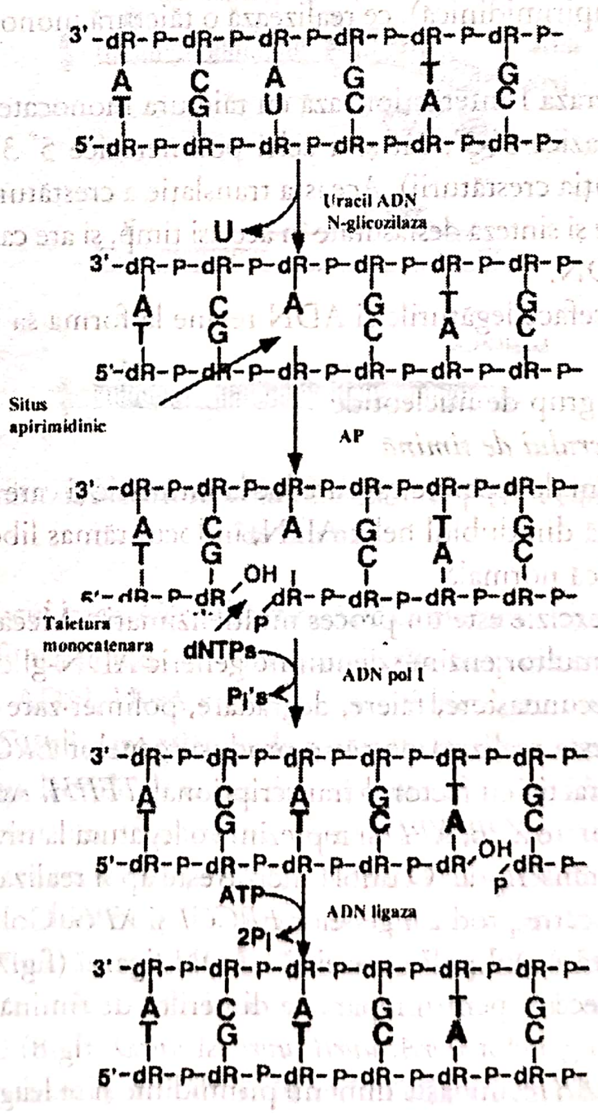

3'-dR-P-dR-P-dR-P-dR-P-dR-P-dR-P-
A C A G T G
T G U C A C
5'-dR-P-dR-P-dR-P-dR-P-dR-P-dR-P-
U
Uracil ADN
N-glicozilaza
Situs
apirimidinic
AP
OH
P
Taietura
monocatenara
dNTPs
Pi's
ADN pol I
ATP
2Pi
ADN ligaza

Fig. 6 — Eliminarea U din ADN.

În primul caz, efectul nu este major, deoarece U are aceleași proprietăți de împerechere ca și T, astfel încât, în cea de a doua rundă de replicare se va reface perechea normală A-T. În cel de al doilea caz însă, modificarea este mutagenică, deoarece deaminarea C face ca în a doua rundă de replicare, perechea GC să fie înlocuită cu AT.

Datorită deaminării C, uracilul trebuie eliminat din ADN, indiferent de sursa care îl produce. Mecanismul acestei excizii este prezentat în figura 6.

Etapele eliminării U:

– eliminarea U de către enzima uracil-ADN N-glicozilaza care excizează U, tăind legătura dintre baza azotată și zahar;

– eliminarea U lasă un situs apirimidinic care este recunoscut de către enzima AP (endonuclează apirimidinică), ce realizează o tăietură monocatenară în ADN, la situsul respectiv;

– ADN polimeraza I interacționează cu tăietura monocatenară, atât pe baza activității exonucleazice 5'-3', cât și a celei polimerazice 5'-3', realizând „**nick translation**" (traslația crestăturii). Aceasta translație a crestăturii se produce prin acțiuni de degradare și sinteză desfășurate în același timp, și are ca rezultat, repararea zonei lezate din ADN.

– ADN ligaza reface legăturile și ADN revine la forma sa inițială.

b) Excizia unui grup de nucleotide

Eliminarea dimerului de timină

Este un mecanism de reparare care are loc la întuneric și care conduce la excizia dimerului de timină din dublul helix ADN, în locul rămas liber fiind formată o secvență nucleotidică normală.

Repararea prin excizie este un proces multienzimatic. Mecanismul se bazează pe intervenția mai multor enzime denumite generic ADN-glicozilaze, și implică mai multe etape: recunoaștere, tăiere, degradare, polimerizare și ligare.

Recunoașterea este realizată de către produșii genelor *ERCC1, XPA, XPF* și este urmată de interacția cu factorul transcripțional *TFIIH*. Acest factor conține genele cu rol în reparare *XPB, XPD* și reprezintă o legătură la nivel molecular între repararea ADN și transcripție. O dublă incizie este apoi realizată de o parte și de alta a dimerului de către produșii genelor *ERCC1* și *XPG*. Golul rămas este apoi umplut sub acțiunea ADN polimerazei și a ADN ligazei (fig.7).

La *E. coli* este necesar pentru repararea dimerilor de timină un complex de 4 proteine, produși ai genelor *uvrA, uvrB, uvrC* si *uvrD* (fig.8).

Complexul *UvrAB* recunoaște dimerul pirimidinic și se leagă la leziune. *UvrA* este atât ATP-ază, cât și proteină de legare la ADN (conține motive **Zn finger**); aceasta recunoaște și se atașează la ADN cu leziuni, având totodată, funcția de a

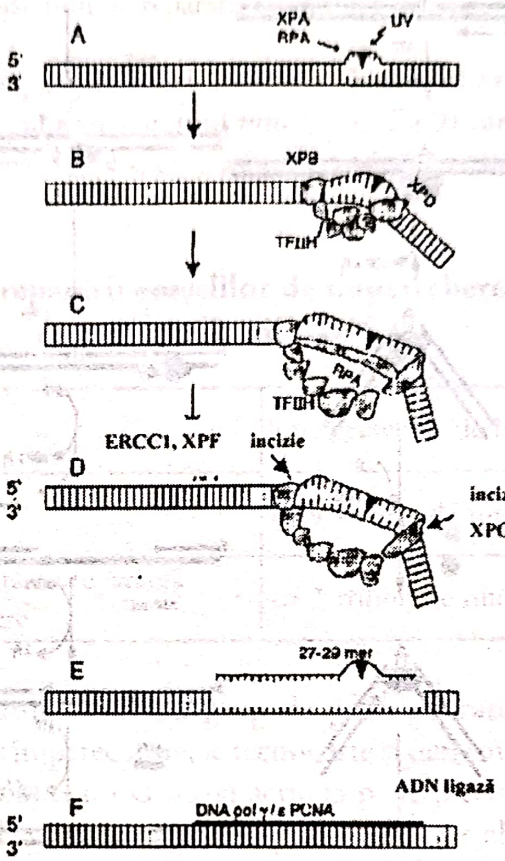


Fig. 7 — Mecanismul exciziei reparatorii desfășurat pentru eliminarea dimerilor de timină.

conduce UvrB la locul lezat. *UvrB* funcționează ca endonuclează, dar și ca ATP-ază (această din urmă funcție fiind evidentă numai atâta timp cât este cuplată cu UvrA). Ulterior atașării la ADN, UvrA este eliminată și locul său este preluat de *UvrC*. Complexul *UvrBC* realizează tăieturi de o parte și de alta a zonei cu leziuni, *UvrC* la aproximativ 7 nucleotide de capătul 5' al dimerului, iar *UvrB*, la 4 nucleotide de capătul 3' al dimerului. Combinația între cele două proteine *UvrBC* va realiza crestătura monocatenară și îndepărtarea nucleotid cu nucleotid în direcția 5'→3', de o parte și de alta a dimerului, incluzând și dimerul însuși, cu formarea unui gol.

UvrD este o helicază care ajută la desfacerea helixului ADN pentru a elibera monocatena dintre cele două incizii, putându-se astfel elimina o zonă de aproximativ 12-13 nucleotide.

În catena de la nivelul căreia dimerul a fost excizat, rămânâne un capăt 3'-OH liber, astfel că, ADN polimeraza I, utilizându-l, poate acționa ca enzimă polimerazică propriu-zisă, spre a determina sinteza unui segment monocatenar,

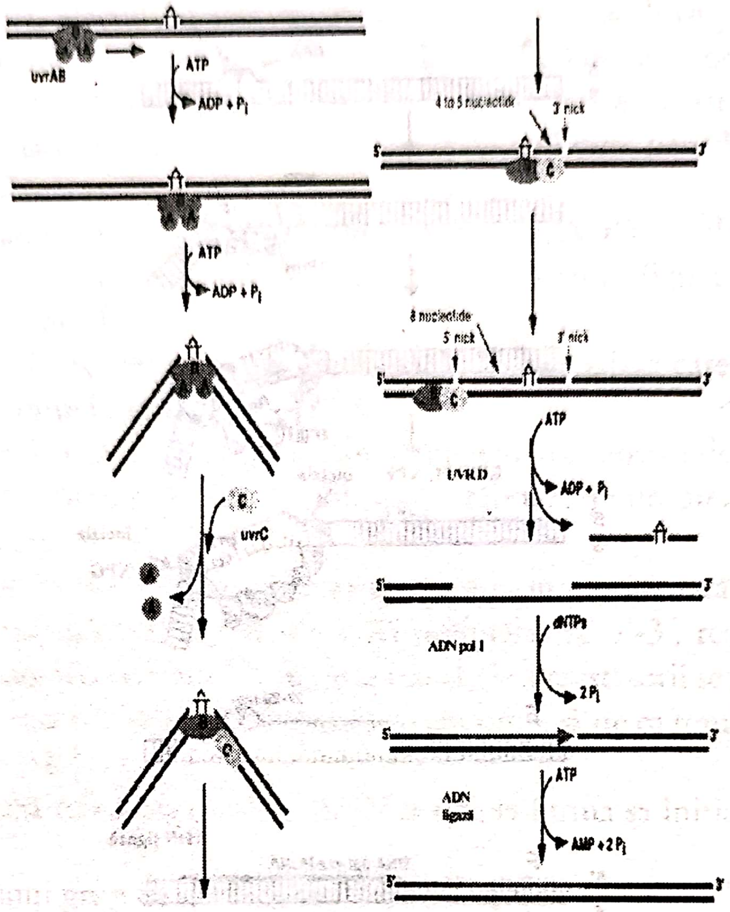

UvrAB
ATP
ADP + P_i
ATP
ADP + P_i
C
uvrC
C
4 to 5 nucleotide
3' nick
5'
3'
8 nucleotide
5' nick
3' nick
5'
3'
ATP
UVRD
ADP + P_i
5'
3'
dNTPs
ADN pol I
2 P_i
5'
3'
ATP
ADN ligază
AMP + 2 P_i
5'
3'

Fig. 8 — Mecanismul de reparare prin excizie, sub acțiunea complexului *UvrABC*.

în direcția 5'→3', folosind ca matriță catena intactă. Are loc polimerizarea de nucleotide, până ce catena nou sintetizată atinge capătul 5'-fosfat al catenei rupte. În acest moment intevine ADN-ligaza care reface integritatea catenei.

Există și alternativa ca crestătura inițială să fie extinsă în urma acțiunii exonucleazei RecBC (exo V), iar golul mare ce se formează, să fie completat de către ADN polimeraza I sau ADN polimeraza III și fragmentul sintetizat să fie unit la catenă cu ajutorul ADN-ligazei.

Această reparare prin excizie se desfășoară diferențiat, pentru zone diferite ale genomului, în funcție de tipul ADN afectat (activ sau inactiv, din punct de vedere transcripțional), prin mecanisme care încă nu sunt pe deplin lămurite.

Mutanții care au defecte în repararea prin acest mecanism sunt sensibili la UV și la agenți mutageni radiomimetici. Oamenii care moștenesc **xeroderma pigmentosum** (boală caracterizată prin defecte în repararea ADN) sunt foarte sensibili la lumina solară și au un risc mai ridicat de a dezvolta cancere ale pielii.

4.3. Sistemul de reparare a greșelilor de împerechere:

Sistemul acționează asupra bazelor incorect împerecheate sau neîmperecheate. Cel mai cunoscut la *E.coli* este sistemul *mut LHS*, (fig.9) care începe să funcționeze imediat după replicarea ADN și care asigură o acuratețe de 100-1000x mai mare a replicării. (tabel 1)

Tabel 1 Efectul reparării greșelilor de împerechere asupra acurateții replicării ADN

Tipul replicării	Rata greșelilor de împerechere
Replicarea ADN	1 / 1 milion de nucleotide copiate
Replicarea ADN cuplată cu repararea greșelilor de împerechere	1 / 1 trilion de nucleotide copiate

Sistemul este alcătuit dintr-un grup de proteine care „scanează“ ADN, în căutarea bazelor greșit împerecheate, le recunoaște și determină eliminarea acestora, astfel încât, ADN polimeraza să poată acționa pentru refacerea secvenței.

Studiile realizate la om au dovedit că proteinele care alcătuiesc acest complex sunt asemănătoare cu cele de la *E.coli* și cu cele de la eucariotele inferioare.

Repararea necesită produsul genelor *mutS, mutL, mutH*, care se presupune că funcționează ca un complex. Aceste gene au fost inițial identificate ca *gene mutatoare,* deoarece mutațiile lor determinau un proces reparator defectuos și o rată mai mare de mutații, comparativ cu cazul normal, în celulele respective.

Acest sistem poate diferenția catena parentală de catena fiică. Diferența dintre cele două este dată de faptul că, noua catenă (fiică) nu a fost încă metilată, cea parentală fiind deja metilată. Grupările metil sunt atașate la A din secvența GATC, la scurt timp după replicare și, ca urmare, catena nou sintetizată este nemetilată.

MutS recunoaște și se atașează la bazele greșit împerecheate; *MutL* acționează ca o proteină de legătură care leagă *MutS* de *MutH* în cadrul complexului și previne disocierea *MutS* din zona cu leziuni. *MutH* se atașeazaă la situsurile hemimetilate GATC și clivează catena nemetilată, astfel încât, sectorul din ADN care conține greșelile de împerechere este eliminat. Golul este apoi umplut sub acțiunea ADN polimerazei I și al ADN ligazei.

Un aspect important de remacat este faptul că, cele trei gene *mutS, mutL* și *mutH* nu sunt aditive, o mutație la nivelul oricăreia dintre ele inactivând întreagul complex.

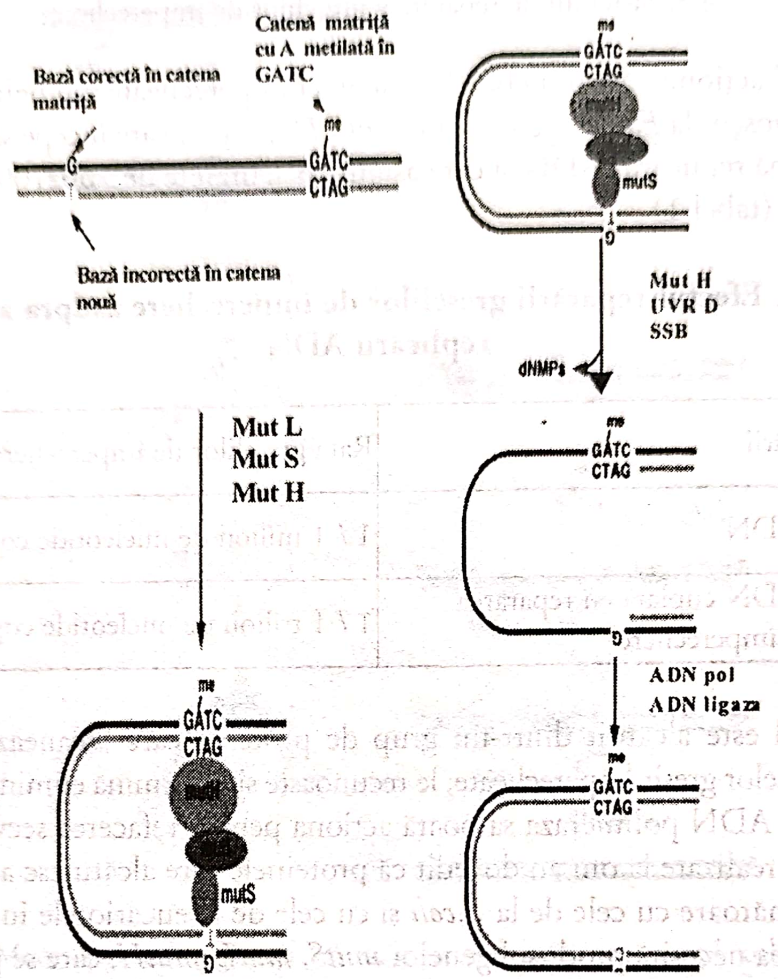

Catenă matriță cu A metilată în GATC
Bază corectă în catena matriță
me
G
GATC
CTAG
Bază incorectă în catena nouă
me
GATC
CTAG
mutS
G
Mut H
UVR D
SSB
dNMPs
Mut L
Mut S
Mut H
me
GATC
CTAG
G
ADN pol
ADN ligaza
me
GATC
CTAG
mutS
G
me
GATC
CTAG
G

Fig. 9 — Eliminarea greșelilor de împerechere.

Acest sistem de reparare poate acționa de la distanță, cu alte cuvinte, o împerechere greșită poate fi reparată, chiar dacă cel mai apropiat situs hemimetilat este la o distanță de 1000pb.

4.4. Repararea postreplicativă recombinatorie

Repararea prin recombinare postreplicativă are loc tot în cazul formării dimerilor de timină, desfășurându-se la nivelul discontinuităților care apar în catena nou sintetizată, datorate nereparării, în timpul replicării, a dimerilor de timină. Acest sistem de reparare postreplicativă a fost descoperit de către Rupp și Howard-Flanders, în anul 1968, la *E. coli*, tulpina K_{12}, defectivă în fotoreactivare și în excizia dimerilor de timină. Totuși, s-a constatat că această tulpină supraviețuiește datorită faptului că își repară ADN pe o altă cale decât cea a fotoreactivării sau a exciziei dimerilor de timină.

În acest caz, dimerii de timină nu blochează replicarea, apărând pe de o parte o catenă cu dimeri timinici, iar pe de altă parte o catenă cu goluri la nivelul corespunzător dimerilor timinici, de pe catena complementară. Golurile apărute în ADN ar fi reparate printr-un mecanism de recombinare genetică la nivelul molecular, între o catenă fiică și catena complementară care conține goluri la nivel diferite, după care are loc o sinteză reparatorie, postreplicativă.

Repararea postreplicativă este o reparare recombinatorie care implică un schimb între ADN preexistent, urmat de o sinteză reparatorie.

Pentru a înțelege mecanismul reparării recombinative, este necesar să se cunoască efectul unui dimer de timină, asupra replicării ADN. Când ADN-pol a ajuns la un dimer de timină, bifurcația de replicare este temporar blocată. Un dimer de timină este totdeauna capabil să formeze punți de hidrogen cu 2 adenine din cauză că modificarea chimică în dimerizare nu alterează grupările care se angajează în legăturile de hidrogen. Cu toate acestea, dimerul induce o distorsiune în helix și când o adenină este adăugată în lanțul de creștere, ea este imediat înlăturată ca și cum ar fi o bază greșită. O celulă în care sinteza ADN este permanent blocată, nu poate completa un ciclu de replicare.

Repararea postreplicativă prin recombinare genetică se realizează astfel: replicarea unei molecule dublu-catenare iradiate cu UV duce la nașterea a două molecule fiice dintre care, una este intactă, normală și alta conține un gol în catena nou sintetizată, opus dimerului de timină, rămas nereparat. Între cele două molecule fiice are loc un eveniment de recombinare genetică, în cadrul căreia, este excizată o porțiune din catena intactă a moleculei fiice normale ce corespunde golului din molecula fiică afectată. Golul secundar, apărut în catena replică a molecului fiice normale, în urma exciziei porțiunii transferate, este reumplut printr-o replicare reparatorie, folosindu-se ca matriță catena complementară intactă. Prin intervenția ADN-ligazei sunt reunite capetele libere în fiecare catenă. (fig. 10)

Repararea post-replicativă recombinatorie este un tip de replicare nonconservativă a ADN. Procesul necesită produsul activ al genei *recA*, care este implicat în recombinare, din care cauză s-a tras concluzia că, în cadrul acestui mecanism de reparare, intervine un proces de recombinare.

Recombinarea reparatorie se realizează printr-un mecanism de schimb de catenă soră care conduce la refacerea a două molecule bicatenare corecte.

Golurile produse în urma replicării se deosebesc de cele produse prin excizia reparatorie, deoarece, în dreptul lor, pe catena opusă, nu se află un segment de ADN care să poată funcționa ca o matriță normală (așa cum se întâmplă în excizia

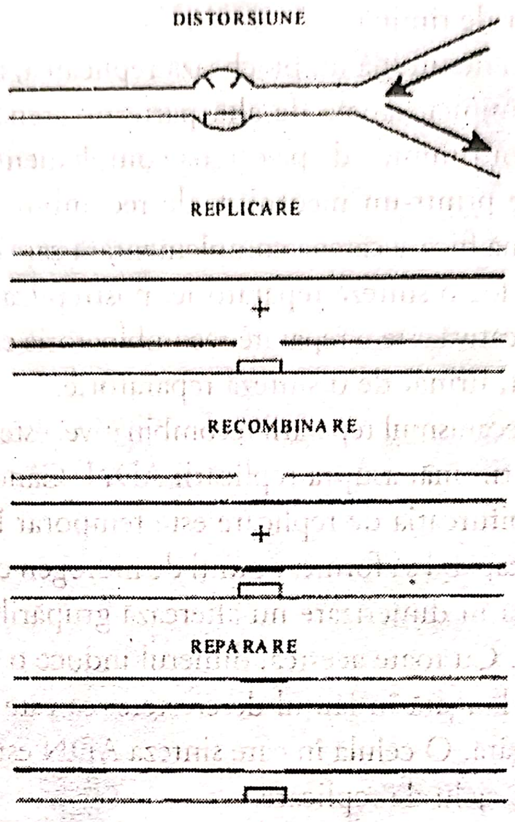


Fig. 10 — Mecanismul reparării ADN prin recombinare post-replicativă.

reparatorie), ci se află dimeri timinici. Aceste goluri nu pot fi reparate deci, prin mecanismul exciziei reparatorii.

Mecanismele reparatorii cooperează în așa fel încât, cel puțin unul dintre ele să-și îndeplinească eficient rolul de reparare a leziunilor din ADN. Mecanismul de reparare prin recombinare post-replicativă poate oferi posibilitatea ca o anumită secvență de baze din molecula reparată să difere de secvența corepunzătoare din molecula parentală și astfel, să stea la baza apariției mutațiilor prin iradiere UV.

4.5. Repararea SOS

SOS este un sistem de ocolire (**bypass system**) care permite alungirea catenei ADN peste segmentele afectate de mutagen, cu prețul fidelității reduse a replicării.

Acesta este deci, un sistem de reparare predispus la erori. Cu toate că se produc catene intacte de ADN, acestea prezintă adesea deficiențe. Principiul de acțiune a sistemului SOS este că supraviețuirea cu o oarecare pierdere de informație este

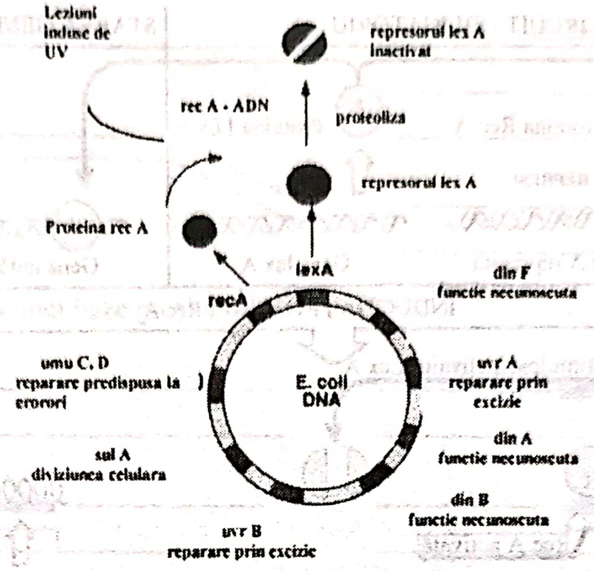

Leziuni induse de UV
represorul lex A inactivat
rec A • ADN
proteoliza
represorul lex A
Proteina rec A
lexA
recA
din F funcție necunoscuta
umu C, D reparare predispusa la erori
E. coli DNA
uvr A reparare prin excizie
din A funcție necunoscuta
sul A diviziunea celulara
din B funcție necunoscuta
uvr B reparare prin excizie

Fig. 11 — Gene reglate de represorul LexA.

mai bună decât nesupraviețuirea sistemului biologic. El are la bază o relaxare a acțiunii de corecție a copierii exercitată de polimeraze, care permite, astfel, sinteza transdimerică, în ciuda distorsionării helixului ADN. Când sistemul SOS este activat, sistemul de corecție nu reacționează la distorsionare, bifurcația de replicare avansează și adeninele sunt plasate în catenele fiice la situsurile specificate de timinele din dimer. ADN-ul afectat induce un sistem de replicare predispus la erori care are o capacitate de corecție a copierii mult mai redusă decât sistemul normal de replicare.

Mecanismul SOS este mobilizat prin interacțiunea dintre proteina Rec A cu represorul Lex A. (fig. 12)

Evenimentul inițial este activarea proteinei Rec A. In vitro, activarea Rec A necesită prezența de ADN monocatenar și ATP. Astfel, semnalul activator poate fi prezența unei regiuni monocatenare într-un locus modificat. Indiferent de forma pe care o ia semnalul, răspunsul SOS apare în câteva minute de la tratament. Proteina Rec A activă stimulează clivarea proteolitică a proteinei Lex A. Proteina Rec A are trei funcții principale: afinitate de legare la monocatene, funcție de recombinază și funcție proteazică.

Lex A este o proteină mică (GM= 22000 D), relativ stabilă în celulele netratate, unde funcționează ca un represor al mai multor operoni (fig.11).

Genele *lex A* au fost identificate prin fuzionarea întâmplătoare a operonului SOS la gene *lac Z* și prin determinarea nivelului crescut al beta-galactozidazei în urma tratării celulelor cu un agent ce induce modificări. Au fost identificate, astfel,

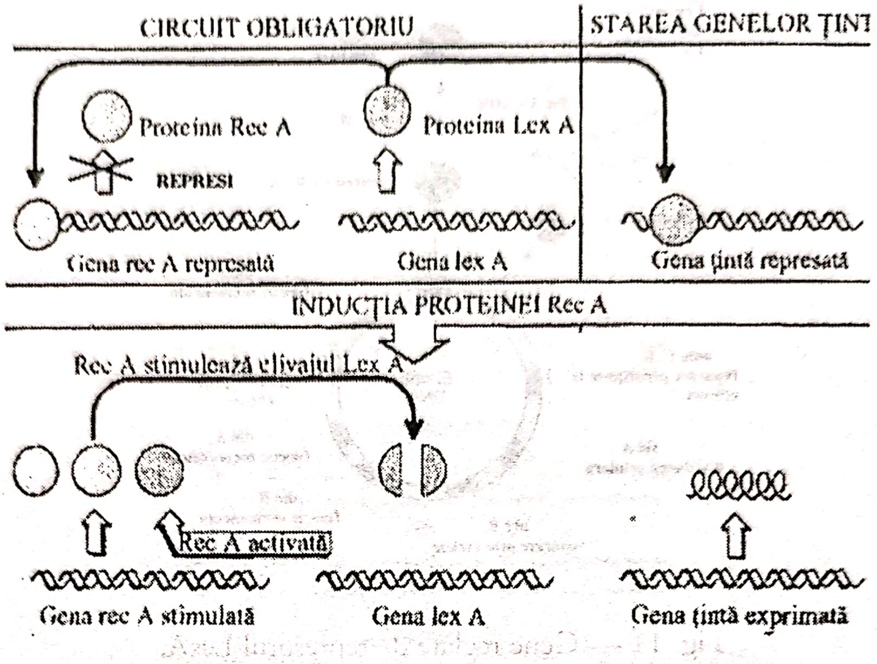

CIRCUIT OBLIGATORIU
STAREA GENELOR ŢINT
Proteina Rec A
Proteina Lex A
REPRESI
Gena rec A represată
Gena lex A
Gena ţintă represată
INDUCŢIA PROTEINEI Rec A
Rec A stimulează clivajul Lex A
Rec A activată
Gena rec A stimulată
Gena lex A
Gena ţintă exprimată

Fig. 12 — Mecanismul prin care interacționează proteinele RecA și LexA.

cinci gene responsabile, numite *din* (**damage inducible**). Genele cunoscute anterior ca făcând parte din răspunsul SOS prin activarea produșilor lor sunt următoarele: *rec A, lex A, uvr A, uvrB, umuC* și *himA*.

Reacția de clivare este neobișnuită. Când proteina Rec A devine activă ea determină clivarea proteinei Lex A, inactivând funcția ei de represor. Genele țintă pentru Lex A includ majoritatea genelor cu funcție de reparare.

Unele gene SOS sunt active doar în celulele tratate, altele sunt active în celulele netratate, dar nivelul de expresie este crescut prin clivarea proteinei LexA. În cazul genei *uvrB*, care este o componentă a sistemului de reparare prin excizie, aceasta are doi promotori: unul funcționează independent de *lexA*, celălalt este supus controlului său. Astfel, după clivarea proteinei LexA, gena poate fi exprimată atât de la promotorul secundar, cât și de la primul promotor.

LexA represează genele țintă prin legarea ei la o secvență de ADN, numită **cutia SOS**. Această secvență prezintă simetrie și, în fiecare locus țintă este prezentă o copie. Cutiile SOS din loci diferiți nu sunt identice, dar sunt conforme unei secvențe cu 8 poziții conservate, reprezentând secvențe consens.

RecA și LexA sunt ținte reciproce în circuitul SOS. Proteina RecA declanșează clivarea proteinei LexA care represează gena *recA* și genele țintă.

Creșterea ratei de sinteză a proteinei RecA este absolut necesară pentru rolul ei direct în repararea recombinativă. Concentrația proteinei RecA devine de 50

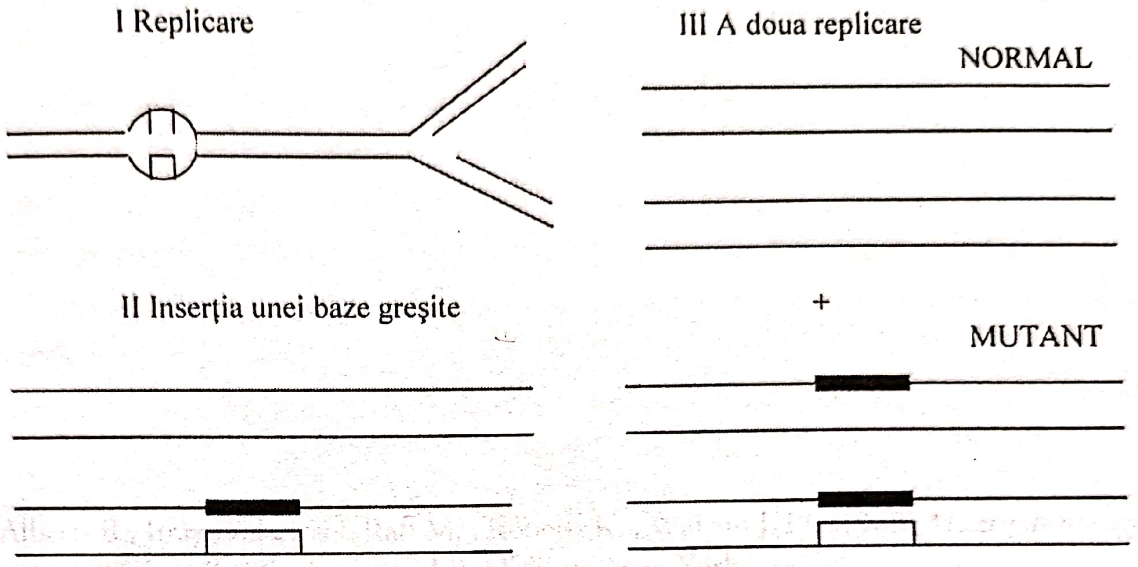

I Replicare
II Inserţia unei baze greşite
III A doua replicare
NORMAL
+
MUTANT

Fig. 13 — Mecanismul replicării SOS.

de ori mai mare decât nivelul de bază și această situație permite proteinei RecA să cliveze toate moleculele de LexA și să împiedice restabilizarea represiei asupra celulelor țintă.

În absența unei RecA active, gena *lexA* se exprimă la un nivel înalt și o cantitate mare de LexA se acumulează în formă neclivată și blochează genele SOS. Aceasta explică de ce răspunsul SOS este reversibil.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

Alberts B., Bray D, Lewis J, Raff M. , Roberts K. , Watson J. D. (1989) *Molecular biology of the cell*, 2nd ed. Garland Publishing, New York.

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. (1994) *Molecular Biology of The Cell*, 3rd ed., Garland Publishing.

Alt F.W. si colab. (1992) *VDJ recombination*, Immunol. Today 13:306.

Alvarez J., Smyth D. R. (1999) *CRABS CLAW and SPATULATA two* ***Arabidopsis*** *genes that control carpel Development in paralel with AGAMOUS*, Development of Biological Sciences 126:2377-2386.

Amabis, J. M. (1974) *Induction of DNA synthesis in* ***Rhynchosciara angelae*** *salivary glands*, Cell Differ. 3:199-207.

Ammermann D. (1987) *Giant Chromosomes in Ciliates*, Results and Problems in Cell Differentiation 14:199-213.

Anderson K.V., Bokla I.., Nusslein-Volhard C. (1985) *Establishment of dorsal-ventral polarity in the* ***Drosophila*** *embryo: the induction of polarity by the* ***Toll*** *gene product*, Cell 42: 791-798.

Anderson S. et al (1981) *Sequence and organization of the human mitochondrial genome*, Nature 290:457-465.

Angelier N., Penrad-Mobayed M., Billoud B., Bonnanfant-Jais, M.I.., Coumailleau P. (1996) *What role might lampbrush chromosomes play in maternal gene expression?*, International J. of Developmental Biology 40(4):645-652.

Antohi S., Gavrila I.. (1981) *Progrese in genetica moleculară*, Ed. St. și Enciclop. București.

Arai N., Kornberg A. (1981) *Unique primed state of phage ΦX174 DNA replication and mobility of the primosome in a direction opposite chain synthesis*, Proc. Natl. Acad.

Donis-Keller J., et al. (1987) *A genetic linkage map of the human genome,* Cell 51: 319-337.

Dorrizi M., Richard-Mercier N., Pieau C. (1996) *The ovary retains male potential after the thermosensitive period for sex determination in the turtle* ***Emys orbicularis,*** Differenciation 60:193-201.

Dranamaraju W. R. (1965*) The function of Y chromosome in man, animal and plants,* Advances in Genetics 13:275-288.

Dreyfuss G. et al (1993) *hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA.* Ann. Rev. Biochem, 62: 289-321.

Drlica K., Rouviere-Yaniv J. (1987) *Histone-like proteins of bacteria,* Microbiol Rev. 51:301-319.

Drouin G., Dover G.A. (1987) *A plant processed pseudogene,* Nature 328:557-558.

Dujon B. et al. (1994) *Complete nucleotide sequence of Saccharomyces cerevisiae chromosome VIII,* Science 265:2077-2082.

Egea-Cortines M., Saedler H., Theissen G. (1999) *Ternary complex formation between the MADS-box proteins SQUAMOSA, DEFICIENS and GLOBOSA is involved in the control of floral architecture in* ***Antirrhinum majus,*** EMBO J. 18: 5370-5379.

Eisenberg J.C., Elgin S.C.R. (1991) *Boundary in the control of gene expression,* Trends Genet. 7:335-340.

Epstein C.J., Smith S., Travis B., Tucker G. (1978) *Both X chromosome function before visible X chromosome inactivation in female mouse embryo,* Nature 274:500-3.

Feagin J.E., Abraham, J.M., Stuart K. (1988) *Extensive editing of the cytochrome c oxidase III transcript in* ***Trypanosoma brucei,*** Cell 53: 413-422.

Feldman M.W., Otto S.P., Christiansen F.B. (1997) *Population Genetic Perspectives on the Evolution of Recombination,* Annu. Rev. Genet. 30:261-295.

Felsenfeld G. (1992) *Chromatin as an essential part of the transcriptional mechanism,* Nature 355: 219-224.

Felsenfeld G., McGhee J. D. (1986) *Structure of the 30 nm chromatin fiber,* Cell 44:375-377.

Finch J.T. et al. (1977) *Structure of nucleosome core particles of chromatin,* Nature 269:29-36.

Finnegan D.J. (1985) *Transposable elements in eukaryotes,* Int. Rev. Cytol. 93:281-326.

Fischer D., Hock R., Scheer D. (1990) *DNA topoisomerase II is not detectable on lampbrush chromosomes but enriched in the amplified nucleoli of* ***Xenopus*** *oocytes,* Experimental Cell Research 209(2):255-260.

Nilsen T. (1993) ***trans****-splicing of nematode pre-mRNA*, Ann. Rev. Microbiol. 47: 413-440.

Nomura M. et al. (1984) *Regulation of the synthesis of ribosomes and ribosomal components*, Ann. Rev. Biochem. 53: 65-117.

Nossal N.G. (1983) *Prokaryotic DNA replication systems*, Ann. Rev. Biochem. 52:581-615.

Nusselein-Vollhard C., Wieschaus E. (1980*) Mutations affecting segnent number and polarity in* ***Drosophila***, Nature 287: 795-801.

Ohno S. (1967) *Sex Chromosomes and Sex-Linked Genes*, Berlin: Springer-Verlag.

Ohno S. (1970) Evolution by Gene Duplication, Springer Verlag, Berlin.

Ohno S. (1979) *Major sex determination genes*, Springer Verlag , N.Y.

Ohyama K. et al. (1986) *Chloroplast gene organization deduced from complete sequence of liverwort* ***M. polymorpha*** *chloroplast DNA*, Nature 322:572-574.

Oliver S.G. et al. (1992) *The complete DNA sequence of yeast chromosome III*, Nature 357:38-46.

Padgett R.A. et al. (1986) *Splicing of messenger RNA precursors*, Ann. Rev. Biochem. 55: 1119-1150.

Palmer J.D. (1985) *Comparative organization of chloroplast genomes*, Ann. Rev. Genet. 19:324-354.

Patterson B., Guthrie C. (1987) *An essential yeast snRNA with a U5-like domain is required for splicing* ***in vivo***, Cell 49: 613-624.

Pavan C., Brito Da Cuhna A. (1969) *Gene amplification in ontogeny and phylogeny of animals*, Genetics 61(1-2).

Pelficer A. et al (1980) *Altering genotype and phenotype by DNA-mediated gene transfer*, Science 209:1414-1422.

Penny G. D. et al. (1996) *Requirement for Xist in X chromosome inactivation*, Nature 379:131-137; 90:907-916.

Ptashne M. (1988) *How eukaryotic transcriptional activators work*, Nature 335: 683-689.

Ptashne M. (1992) *A Genetic Switch*, Cell Press and Blackwell Scientific, Cambridge.

Putteril J., Robson F., Lee K., Simon R., Coupland G. (1995) *The constans gene of* ***Arabidopsis*** *promotes flowering and encodes a protein showing similarites to zinc finger transcription factors*, Cell 80:847-857.

Raymond C.S., Zarkower D. (2000) ***Dmrt-1*** *is required for mammalian testis differentiation*, Genes Dev. 14:1587-1595.

Zakian V.A. (1996) *Structure,function, and replication of S. cerevisiae telomeres*, Ann. Rev. Genet. 30:141-172.

Zarnea G. (1986) *Tratat de microbiologie generală*, vol. 2, Ed. Academiei, București.

Zărnescu O. (1999) *Biologia moleculară a dezvoltării*, partea I, Ed. Univ. București.

Zenzes M. T. (1987) *Chromosome Analyses Using Human Spermatozoa*, Cytogenetics, Basic and Applied Aspects, Springer-Verlag Berrlin.

Zhuang Y., Weiner A.M. (1986) *A compensatory base change in Ul snRNA suppresses a 5' splice site mutation*, Cell 46: 827-835.

Zhuang Y.A., Goldstein A.M., Weiner A.M. (1989) *UACUAAC is the preferred branch site for mammalian mRNA splicing*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86:2752-2756.

Zimmerly S., et al. (1995) *Group II intron mobility occurs by target DNA-primed reverse transcription*, Cell 82: 545-554.

Zubay Geoffrey (1987) *Genetics*, The Benjamin/Cummings Publishing Company, INC.

Zurawski G. et al. (1978) *Translational control of transcription termination at the attenuator of the* ***E. coli*** *tryptophan operon*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:5988-5991.

Zyskind J.W., Smith D.W. (1980) *Nucleotide sequence of the S. typhimurium origin of DNA replication*, Proc Natl. Acad. Sci. USA 77:2460-2464.